

**Rationale Strategien zur Isolierung bakterieller Lassoptide -
Struktur, Biosynthese und Anwendungspotential**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Thomas Knappe
aus Freiburg im Breisgau

Marburg an der Lahn 2010

Vom Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
am 29.03.2010 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. M. A. Marahiel
(Philipps-Universität Marburg)
Zweitgutachter: Prof. Dr. L.-O. Essen
(Philipps-Universität Marburg)

Tag der Disputation: 29.04.2010

FÜR KAMILA

Der Hauptteil dieser Arbeit wurde in folgenden Artikeln veröffentlicht:

Knappe T.A., Linne U., Zirah S., Rebuffat S., Xie X. and Marahiel M.A. Isolation and structural characterization of capistruin, a lasso peptide predicted from the genome sequence of *Burkholderia thailandensis* E264. *J Am Chem Soc* **2008**, 130 (34), 11446-11454.

Knappe T.A., Linne U., Robbel L. and Marahiel M.A. Insights into the biosynthesis and stability of the lasso peptide capistruin. *Chem Biol* **2009**, 16 (12), 1290-1298.

Knappe T.A., Linne U., Xie X. and Marahiel M.A. The glucagon receptor antagonist BI-32169 constitutes a new class of lasso peptides. *FEBS Lett* **2010**, 584 (4), 785-789.

Weitere Publikationen des Autors:

Knappe T.A., Eckert B., Schaarschmidt P., Scholz C. and Schmid F.X. Insertion of a chaperone domain converts FKBP12 into a powerful catalyst of protein folding. *J Mol Biol* **2007**, 368 (5), 1458-1468.

Samel S.A., Schoenafinger G., **Knappe T.A.**, Marahiel M.A. and Essen L.O. Structural and functional insights into a peptide bond-forming bidomain from a nonribosomal peptide synthetase. *Structure* **2007**, 15 (7), 781-792.

Duquesne S., Destoumieux-Garzón D., Zirah S., **Knappe T.A.**, Goulard C., Peduzzi J., Marahiel M.A. and Rebuffat S. Post-translational modification and folding of a lasso-type gene-encoded antimicrobial peptide require two enzymes only in *Escherichia coli*. *Adv Exp Med Biol* **2009**, 611, 35-36

Robbel L., **Knappe T.A.**, Linne U., Xie X. and Marahiel M.A. Erythrochelin - a hydroxamate-type siderophore predicted from the genome of *Saccharopolyspora erythraea*. *FEBS J* **2010**, 277 (3), 663-676.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
1. Einleitung	1
1.1 Naturstoffe	1
1.2 Naturstoffisolierung – Rationale Suche durch Genomisches Mining	1
1.3 Ribosomale und nichtribosomale Peptide	4
1.4 Allgemeines Prinzip der Biosynthese ribosomaler Peptide	5
1.5 Posttranslationale Modifikationen ribosomaler Peptide	6
1.6 Makrozyklische ribosomale Peptide	7
1.6.1 Zirkuläre Bacteriocine	8
1.6.2 Cyanobactine	11
1.6.3 Amatoxine und Phallotoxine	12
1.6.4 Cyclotide	13
1.6.5 θ -Defensine	15
1.6.6 Lasso peptide	16
1.6.6.1 Lasso peptide der Klassen I und II	17
1.7 Microcin J25	20
1.7.1 Struktur und Stabilität von MccJ25	20
1.7.2 Gencluster und Biosynthese von MccJ25	22
1.7.3 Selbstimmunität und biologische Aktivität von MccJ25	26
1.7.4 Spezifität der MccJ25-Biosynthesemaschinerie	26
1.8 Aufgabenstellung	30
2. Material	31
2.1 Geräte	31
2.2 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	32
2.3 Vektoren	34
2.3.1 pET41a(+)	34
2.3.2 pSCrhaB2	34
2.3.3 pCDFDuet	35
2.3.4 pET31b(+)	35
2.3.5 pETMBP_1a	36
2.4 Oligonukleotide	36
2.5 Mikroorganismen	38
2.5.1 <i>Escherichia coli</i> TOP10	38
2.5.2 <i>Escherichia coli</i> NEB 10-beta	38

2.5.3 <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	38
2.5.4 <i>Burkholderia thailandensis</i> E264	38
2.5.5 <i>Streptomyces</i> sp. (DSM 14996)	38
2.5.6 <i>Streptomyces coeruleus</i>	39
2.6 Kulturmedien	39
2.6.1 LB-Medium	39
2.6.2 M9-Medium	39
2.6.3 M20-Medium	40
2.6.4 M63-Medium	40
2.6.5 PB-Medium	40
2.6.6 BI-Medium	41
2.6.7 SCM-Medium	41
3. Methoden	42
3.1 Molekularbiologische Methoden	42
3.1.1 Kultivierung von <i>Burkholderia thailandensis</i> und Präparation chromosomaler DNA	42
3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	42
3.1.3 Konstruktion der Expressionsplasmide	42
3.1.4 Ortsgerichtete Mutagenese	43
3.1.5 Elektrottransformation von <i>B. thailandensis</i> E264	43
3.2 Proteinchemische Methoden	44
3.2.1 Genexpression	44
3.2.1.1 Expression von pET- und pBAD-Vektoren	44
3.2.1.2 Expression von <i>capA</i> als KSI-Fusionsprotein	44
3.2.1.3 Heterologe Produktion von Capistruin	45
3.2.1.4 Heterologe Produktion von Capistruinvarianten	45
3.2.1.5 Homologe Produktion von Capistruinvarianten	45
3.2.1.6 Homologe Produktion von MccJ25 und Derivaten	45
3.2.2 Proteinreinigung	46
3.2.2.1 Zellaufschluss und Probenvorbereitung	46
3.2.2.2 Reinigung von Proteinen mit einem His(6)-Tag	46
3.2.2.3 Reinigung von GST-Fusionsproteinen	46
3.2.2.4 Reinigung von MBP-Fusionsproteinen	47
3.2.2.5 Reinigung von NusA-Fusionsproteinen	47
3.2.3 Präparation von <i>inclusion bodies</i> und Bromcyanspaltung von KSI-Fusionsproteinen	48
3.2.4 Reinigung von Peptiden durch präparative RP-HPLC	48
3.3 Naturstoffisolierung	49
3.3.1 Methanolextraktion	49
3.3.2 Festphasenextraktion der Kulturüberstände mit XAD16	49

3.4 Analytische Methoden	50
3.4.1 MALDI-MS	50
3.4.2 HPLC-MS	50
3.4.3 CID-Fragmentierungsstudien	51
3.4.4 Peptidmassen-Fingerabdruck	51
3.5 Biochemische Methoden	51
3.5.1 Abspaltung von Fusionsproteinen durch die TEV-Protease	51
3.5.2 <i>In vitro</i> Rekonstitution der Biosynthese von Capistruin	52
3.5.3 Carboxypeptidase-Verdau von Lassozeptiden	52
3.5.4 Thermische Stabilitätsstudien und Elastase-Verdau von Capistruinvarianten	52
3.5.5 Reduktion und Reoxidation von BI-32169	53
3.5.6 Untersuchungen zur antibakteriellen Aktivität von Capistruin	53
3.5.7 Bindungsstudien von MccJ25 RGD an $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ Integrine	54
3.5.8 Angiogenesetests von MccJ25 RGD	54
3.5.9 Proliferationshemmtests	55
3.6 Spektroskopische Methoden	55
3.6.1 CD-Spektroskopie	55
3.6.2 NMR-Spektroskopie und Strukturaufklärung	56
3.6.2.1 Capistruin	56
3.6.2.2 BI-32169	57
4. Ergebnisse	58
4.1 Capistruin – ein Lassozeptid aus <i>Burkholderia thailandensis</i> E264	58
4.1.1 Identifizierung eines Lassozeptidbiosynthesecusters durch Genomisches Mining	58
4.1.2 Massenspektrometrische Analyse von Capistruin	61
4.1.3 Einfluss der Wachstumsbedingungen auf die Produktion von Capistruin	62
4.1.4 NMR-spektroskopische Studien und Strukturaufklärung von Capistruin	64
4.1.5 Untersuchungen zur biologischen Aktivität von Capistruin	67
4.1.6 C-terminale Abbauprodukte von Capistruin	68
4.1.7 Heterologe Produktion von Capistruin in <i>E. coli</i>	70
4.1.8 Heterologe Expression und Reinigung von CapA, CapB und CapC	72
4.1.8.1 Heterologe Expression und Reinigung von CapA	72
4.1.8.2 Heterologe Expression und Reinigung von CapB und CapC	73
4.1.9 <i>In vitro</i> Rekonstitution der Biosynthese von Capistruin	74
4.1.10 Mutationsstudien zur Reifung des Lassozeptids Capistruin	74
4.1.10.1 Mutationsanalyse der Proteaseschnittstelle von CapA	75
4.1.10.2 Alaninscan der Lassozeptidsequenz	76
4.1.10.3 Engineering der Lassostruktur von Capistruin	77
4.1.10.4 Fixierung des C-Terminus durch Arg15 innerhalb des Makrolaktamrings	78
4.1.10.5 Capistruin R15A/F16A stellt ein temperatursensitives Lassozeptid dar	79

4.1.10.6 Analyse des Fixierungspotentials sterisch anspruchsvoller Aminosäuren	81
4.1.10.7 Einfluss des Leaderpeptids auf die Capistruinbiosynthese	83
4.1.10.8 Evaluierung des biokombinatorischen Potentials der Lassozeptidbiosynthese	84
4.1.11 Homologe Produktion von Capistruinvarianten in <i>B. thailandensis</i> E264	85
4.2 Der Glucagonrezeptorantagonist BI-32169 ist ein lassostrukturiertes Peptid	87
4.2.1 Massenspektrometrische Analyse von BI-32169	87
4.2.2 NMR-spektroskopische Strukturaufklärung von BI-32169	91
4.3 Anantin – ein weiterer Vertreter der Klasse II-Lassoptide?	94
4.3.1 Massenspektrometrische Untersuchungen von Anantin	94
4.4 Lassoptide als stabile Peptidgerüste – Entwicklung eines Integrininhibitors	96
4.4.1 Einbau und Produktion der RGD-Lassozeptidvarianten	97
4.4.2 Massenspektrometrische Untersuchungen von MccJ25 RGD – Lassostrukturbeweis	98
4.4.3 Integrinbindungsstudien von MccJ25 RGD	101
4.4.4 Angiogenese- und Proliferationshemmstudien von MccJ25 RGD	102
5. Diskussion	104
5.1 Capistruin – ein Lassozeptid aus <i>Burkholderia thailandensis</i> E264	104
5.1.1 Homologe und heterologe Produktion von Capistruin	104
5.1.2 C-terminale Abbauprodukte des Capistruins	105
5.1.3 Struktur und Stabilität des Lassozeptids Capistruin	106
5.1.4 Biosynthese von Capistruin	110
5.1.5 Biologische Aktivität von Capistruin	117
5.1.6 Homologe Gencluster in <i>Burkholderia</i> -Stämmen	118
5.2 Das Klasse III-Lassozeptid BI-32169	120
5.3 Anantin – ein Lassozeptid der Klasse II	123
5.4 Lassoptide als stabile Peptidgerüste für Epitop Grafting	124
5.5 Genomisches Mining von Lassozeptiden – Identifizierung kryptischer Gencluster	126
5.6 Abschließende Bemerkungen	128
6. Literatur	129
Danksagung	138

Zusammenfassung

Bakterielle Lassoptide sind ribosomal synthetisierte, bioaktive Peptide, die sich aus 16 bis 21 proteinogenen Aminosäuren zusammensetzen. Sie zeichnen sich durch eine verzweigt-zyklische Primärstruktur aus, die durch einen N-terminalen Makrolaktamring und einen linearen C-Terminus charakterisiert ist. Der C-Terminus ist nicht frei beweglich, sondern durch den makrozyklischen Ring hindurch gefädelt und dabei entweder durch sterische Hinderung voluminöser Aminosäureseitenketten oder kovalent durch Disulfidbindungen verankert. Die daraus resultierende Lassostruktur führt zu einer außerordentlichen Stabilität gegenüber Proteasen, hohen Temperaturen und chemischen Denaturierungsmitteln und begründet in Kombination mit der genetischen Kodierung und bakteriellen Herkunft das steigende Interesse an diesen einzigartig strukturierten Peptiden.

In dieser Arbeit wurde ein auf Genomischem Mining basierendes Verfahren zur Identifizierung neuer Lassopeptidbiosynthesecuster in Bakterien entwickelt. Mit Hilfe dieser Strategie konnte ein kryptisches Gencluster im Genom von *Burkholderia thailandensis* E264 identifiziert und eine Verbindung mit der Masse des postulierten Lassopeptids im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Strukturuntersuchungen mittels Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie belegten die Lassostruktur der isolierten Verbindung, die Capistruin genannt wurde. Das 19-AS Lassopeptid, das eine antibakterielle Aktivität gegen Vertreter des pathogenen *Burkholderia cepacia*-Komplexes zeigte, konnte durch Expression des Genclusters in *Escherichia coli* heterolog produziert werden. Die anschließende Mutationsanalyse des ribosomalen Vorläuferproteins führte zur Identifizierung von vier Positionen innerhalb der Lassopeptidsequenz, die kritisch für die Reifung des Peptids waren. Innerhalb des Leaderpeptids erwies sich Threonin an der P2-Position der Proteaseschnittstelle als essentiell für die Prozessierung des Vorläufers. Durch eine Stabilitätsanalyse ausgewählter Capistruinvarianten wurden Einblicke in Struktur-Stabilitäts-Beziehungen erhalten und Arg15 als der für die Verankerung des C-Terminus verantwortliche Rest identifiziert. Ferner wurde mit Capistruin R15A/F16A das erste temperatursensitive Lassopeptid generiert, das thermisch in eine verzweigt-zyklische Struktur entfaltet werden kann.

Darüber hinaus wurden die zwei verzweigt-zyklischen Peptide BI-32169 und Anantin massenspektrometrisch und NMR-spektroskopisch untersucht. Dabei konnte für beide Peptide die postulierte Lassostruktur bewiesen werden, die aufgrund der Ähnlichkeit ihrer Primärstruktur mit der von Lassozeptiden vermutet worden war. Der Glucagonrezeptorantagonist BI-32169 unterscheidet sich dabei von den bisherigen Lassozeptiden der Klassen I und II und kann daher als Begründer der neuen Klasse III angesehen werden.

Die relaxierte Substratspezifität der Biosynthesemaschinerie von Lassozeptiden legte eine Verwendung der stabilen Peptidgerüste zur Präsentation von Pharmakophoren nahe, um die intrinsischen Stabilitätseigenschaften mit den Funktionen bioaktiver Epitope zu kombinieren. Die Konversion des Lassopeptids MccJ25 in einen nanomolaren Inhibitor von $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ Integrinen mit anti-angiogenetischer Wirkung durch die Insertion des Integrinbindungsmotivs RGD in das stabile Peptidrückgrat verdeutlicht dieses bisher ungenutzte Potential lassostrukturierter Peptide.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern einen Einblick in die Struktur, Stabilität und Biosynthese von bakteriellen Lassozeptiden und werden in Zukunft das Genomische Mining nach lassostrukturierten Peptiden erleichtern und damit zur Identifizierung von neuen, alternativen Peptidgerüsten beitragen, die zur Präsentation von bioaktiven Epitopen verwendet werden können.

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
AsnB	Asparagin Synthetase B
β -LS	β -Laktamsynthetase
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMRB	Biologische Magnetische Resonanz Datenbank
Bp	Basenpaare
BrCN	Bromcyan
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes H ₂ O
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EIC	Extrahiertes Ionenchromatogramm
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
FPLC	Schnelle Flüssigkeitschromatographie
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	2-N'-[N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IC ₅₀	halbmaximale Inhibitionskonzentration
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
KSI	Ketosteroidisomerase
MALDI-MS	Matrix-unterstützte-Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie
MBP	Maltose-Bindungsprotein
MccJ25	Microcin J25
MCS	Multiple Klonierungsstelle
MeOH	Methanol
MIC	minimale Hemmkonzentration
MS	Massenspektrometrie
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NOE	Kern-Overhauser-Effekt
NRP	nichtribosomales Peptid
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthetase
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm
ORF	offener Leserahmen
PCR	Polymerasenkettenreaktion

PDB	Protein Datenbank
Ppant	4'-Phosphopantethein
P _i	anorganisches Phosphat
pI	isoelektrischer Punkt
RBS	ribosomale Bindungsstelle
rpm	Umdrehungen pro Minute
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
RP	ribosomales Peptid
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sp.	Spezies
SPPS	Festphasenpeptidsynthese
t _R	Retentionszeit
TFA	Trifluoressigsäure
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen

Proteingene Aminosäuren

Aminosäure	3-Buchstabencode	1-Buchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutamat	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

1. Einleitung

1.1 Naturstoffe

Naturstoffe werden als chemische Verbindungen definiert, die über eine biologische Aktivität verfügen und aus natürlichen Quellen (Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren) stammen. Sie werden seit Jahrtausenden von menschlichen Gesellschaften zu unterschiedlichen Zwecken eingesetzt. Die Verdopplung der Lebenserwartung innerhalb des 20. Jahrhunderts liegt unter anderem in der medizinischen Anwendung pflanzlicher und mikrobieller Sekundärmetabolite begründet [1]. Die goldene Ära der Naturstoffe begann mit der Entdeckung des Penicillins durch Fleming im Jahr 1929 und dessen großindustrieller Produktion in den 1940er Jahren. Der große Einfluss von Naturstoffen auf die Gesundheit der Weltbevölkerung wird daran deutlich, dass 60% der zugelassenen Pharmaka Naturstoffe oder von ihnen abgeleitete Verbindungen darstellen [2]. In den Jahren von 1985 bis 2006 stellten Naturstoffe und ihre Derivate einen Anteil von mehr als 50% an allen neu zugelassenen Produkten [3]. Das Marktvolumen beträgt insgesamt mehr als 40 Milliarden US Dollar [4]. Das hohe Potential der Naturstoffe liegt in ihrer chemischen Diversität und Komplexität begründet. Nach biosynthetischen Gesichtspunkten wird zwischen Peptiden, Alkaloiden, Kohlenhydraten, Terpenen, Polyketiden, Fettsäuren und Lipiden unterschieden. Die hohe Komplexität resultiert direkt aus der evolutionären Entwicklung der Naturstoffe. Es wird davon ausgegangen, dass die Strukturen im Laufe der Evolution als Reaktion auf Veränderungen der natürlichen Umgebung entstanden sind. Im Falle eines Selektionsvorteils wurden die für die Biosynthese verantwortlichen Gene beibehalten und durch genetische Modifizierungen weiter optimiert, so dass die heutigen Naturstoffe als Produkte einer natürlichen kombinatorischen Bibliothek verstanden werden können [4]. Die Reaktion auf sich verändernde Umweltbedingungen, insbesondere von Mikroorganismen, als Ursache für die Entstehung der chemischen Diversität ist zugleich ein großer Nachteil bei der Bekämpfung pathogener Vertreter, da diese Adaptation auch die Ausbildung von Resistenzen miteinschließt. Resistenzen gegenüber Antibiotika können durch (I) Inaktivierung der Verbindung mittels eines Enzyms (z.B. β -Laktamase), (II) Reduzierung der intrazellulären Konzentration durch Export des Antibiotikums, (III) Modifizierung des Zielmoleküls zur Verminderung der Affinität des Antibiotikums, (IV) Überproduktion des Zielmoleküls, (V) Überwindung der Notwendigkeit des Zielmoleküls und (VI) Verringerung der Antibiotikaaufnahme vermittelt werden [5]. Diese vielfältigen Strategien zur Resistenzentwicklung machen die ständige Entwicklung neuer Antibiotika notwendig und demzufolge auch die Isolierung und Identifizierung neuer Naturstoffe bzw. Naturstoffgerüste als Leitstrukturen essentiell.

1.2 Naturstoffisolierung – Rationale Suche durch Genomisches Mining

Die Isolierung von Naturstoffen basiert traditionell auf aufwendigen chromatographischen Verfahren zur Gewinnung der Verbindung in reiner Form. Dabei stützt sich die Identifizierung und Verfolgung der Zielverbindung während der Reinigung in der Regel auf ihre biologische Aktivität oder

charakteristische physiko-chemische Eigenschaften. Neben diesem traditionellen Ansatz hat sich innerhalb der letzten Jahre ein neuer, alternativer Ansatz entwickelt, der eine rationalere Herangehensweise erlaubt. Die Weiterentwicklung von Sequenzierungstechnologien hat zu einer signifikanten Beschleunigung und Kostenreduzierung bei der Sequenzierung vollständiger Genome geführt. Die daraus resultierende Vielzahl von DNA Sequenzen unterschiedlicher Organismen in den öffentlichen Datenbanken kann zur Entdeckung neuer chemischer Struktur motive aus natürlichen Quellen genutzt werden [6,7]. Dieses Konzept zur Isolierung neuer Naturstoffe basierend auf der bioinformatischen Analyse der vorhandenen Sequenzinformationen wird als Genomisches Mining bezeichnet [8,9]. Das Potential der steigenden genomischen Information wurde zuerst erkannt, als im Genom von *Streptomyces coelicolor* A3(2) viele Proteine identifiziert wurden, die vermutlich an der Biosynthese bisher unbekannter Naturstoffe beteiligt sind [10]. Die für diese Proteine kodierenden Gene waren, wie bei Bakterien üblich, in Biosyntheseclustern organisiert. Dabei werden Cluster, die nicht mit bekannten Naturstoffen in Verbindung zu bringen sind, als kryptisch bezeichnet [8]. Neben der Organisation von Biosynthesegenen in Clustern zeigen bakterielle Gene keine Unterteilung in Exons und Introns und sind daher prädestiniert für die Entwicklung des rationalen Konzepts des Genomischen Minings. Im Folgenden sollen daher Konzepte für die Isolierung bakterieller Naturstoffe mittels Genomischen Minings vorgestellt werden.

Zur Identifizierung neuer Naturstoffe mittels Genomischen Minings wird zunächst eine bioinformatische Analyse des Genoms durchgeführt, um mögliche Biosynthesegene zu lokalisieren und den kodierten Proteinen putative Funktionen zuzuordnen (Abbildung 1.1). Diese primäre Analyse basiert auf Homologievergleichen mit Proteinen bekannter Funktion. Nach der Identifizierung putativer Biosynthesegene folgt die eingehende bioinformatische Analyse der 5'- und 3'-flankierenden Bereiche, um alle möglichen Komponenten des putativen Clusters zu erfassen. Nach der vollständigen Vorhersage eines Biosynthesecusters können die Kultivierungsbedingungen anhand von RT-PCR, Northern Blots oder Microarray-Studien identifiziert werden, unter denen eine Expression des Clusters stattfindet. Ist unter den analysierten Bedingungen keine Expression zu beobachten, spricht man von einem „stillen“ Gencluster, das durch genetische Manipulation der regulatorischen Gene oder der Promotorregionen aktiviert werden kann [11]. Anzumerken ist hierbei, dass die Wahl der Fermentationsbedingungen einen großen Einfluss auf das Metabolom hat und dass die im natürlichen Habitat zur Expression des Genclusters notwendigen Stimuli oftmals nicht im Labor simuliert werden können. Beispielsweise zeigte der sogenannte OSMAC (one strain many compounds)-Ansatz, dass durch eine systematische Variation der Kultivierungsparameter (Zusammensetzung des Mediums, Sauerstoffgehalt, Kultivierungsgefäß, Anwesenheit von Enzyminhibitoren) 20 unterschiedliche Naturstoffe aus einem Organismus isoliert werden können [12].

Nach der Verifizierung oder Aktivierung der Expression ist das weitere Vorgehen von der vorhandenen Information über den zu isolierenden Naturstoff abhängig. Wenn die Struktur der Zielverbindung teilweise oder vollständig vorhergesagt werden kann, bietet sich eine gerichtete Fraktionierung des Kulturextrakts an, die auf Bioassays, HPLC-MS oder HPLC-DAD basiert. Ein Beispiel für die erfolgreiche Anwendung dieser Strategie ist die Isolierung des Polyen-Makrolaktams Salinilactam A aus dem marinen Actinomyceten *Salinispora tropica* [13]. Durch Sequenzvergleiche

wurde in dessen Genom ein Biosynthesegencluster identifiziert, das ein modular aufgebautes Polyketidsynthasen (PKS)-System enthielt und laut Sequenzanalyse die Assemblierung eines Polyen-Makrolaktams auf der Basis eines Lysins katalysieren sollte. Unter Berücksichtigung der charakteristischen UV-Absorption dieser Struktur motive in Kombination mit MS/NMR-Experimenten konnte der postulierte Naturstoff nachgewiesen werden.

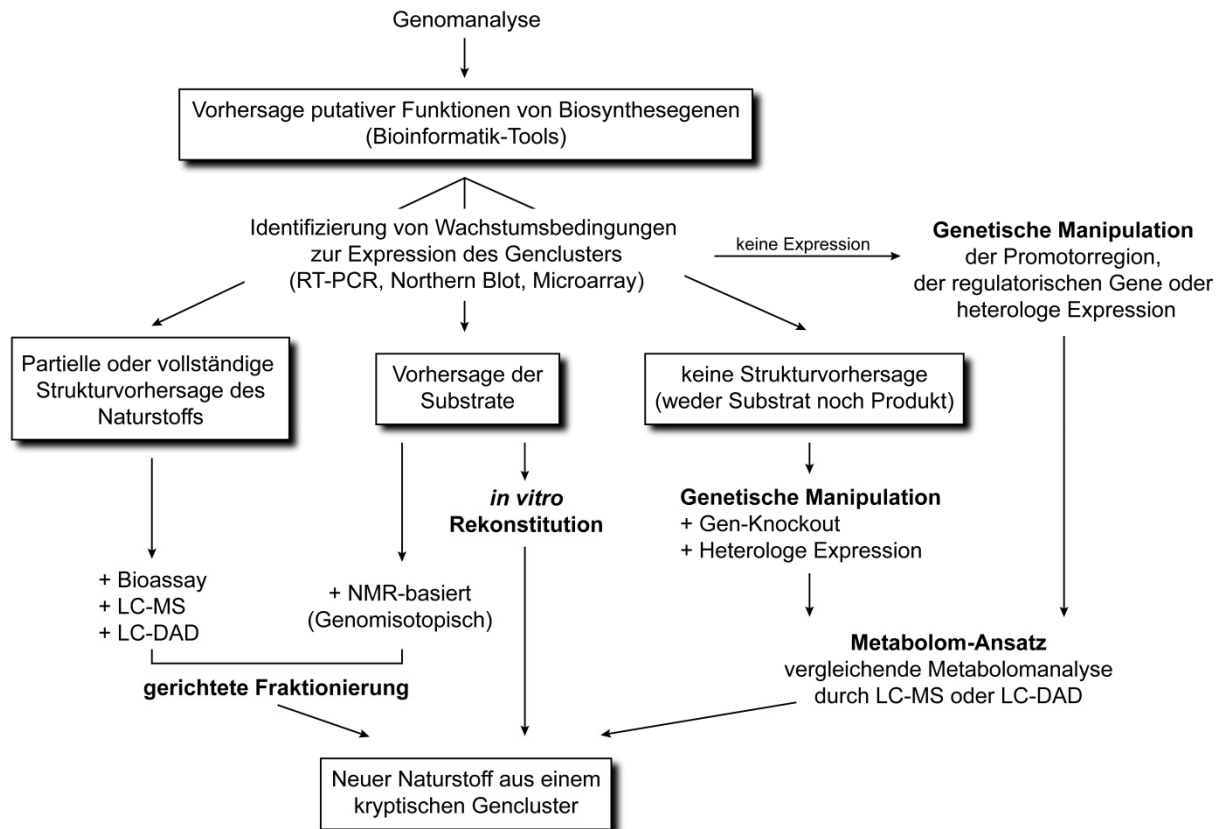


Abbildung 1.1: Strategien zur Isolierung neuer Naturstoffe mittels Genomischen Minings.

Wenn keine Strukturen oder Teilstrukturen auf der Basis des Genclusters formuliert werden können, aber die Vorhersage der verwendeten Substrate möglich ist, kann durch Inkorporation markierter Vorläufermoleküle eine NMR-basierte Fraktionierung und Identifizierung angewendet werden. Diese Strategie ermöglichte die Isolierung des nichtribosomalen Peptids Orfamide A aus *Pseudomonas fluorescens* PF-5 [14]. Durch bioinformatische Analyse der Substratspezifität der an der Biosynthese beteiligten nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) wurde Leucin als Substrat identifiziert und durch Fütterungsexperimente mit ^{15}N -markiertem Leucin in Kombination mit ^1H - ^{15}N HMBC NMR-Experimenten der kryptische Naturstoff in den chromatographischen Fraktionen des Kulturextrakts nachgewiesen und charakterisiert. Alternativ dazu ist mit Hilfe der postulierten Substrate die Identifizierung des kryptischen Naturstoffs durch eine aufwendige *in vitro* Rekonstitution mit gereinigten Einzelkomponenten zu erreichen. Dieser Ansatz führte zur Isolierung des Zweikomponenten Lantibiotikums Haloduracin aus *Bacillus halodurans* C-125, dessen Biosynthese *in vitro* durch Kombination der heterolog exprimierten und gereinigten Proteine mit den postulierten Substraten und Kofaktoren rekonstituiert wurde [15]. Der Vorteil dieser Vorgehensweise ist die

Entkopplung der Biosynthese von jedweder Regulation innerhalb des Wirtsorganismus, wobei der Arbeitsaufwand als gewichtiger Nachteil zu berücksichtigen ist.

Wenn strukturelle Informationen vollständig fehlen, also weder Substrate noch Teilstrukturen des Produkts vorhersagbar sind, kann der kryptische Naturstoff durch gezielte genetische Manipulation, wie beispielsweise Gen-Knockouts oder heterologe Expression, in Kombination mit vergleichender Metabolomanalyse gefunden werden. Ein Beispiel für die erfolgreiche Anwendung dieses Ansatzes ist die Isolierung des Hydroxamat-Siderophors Coelichelin aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) [16,17]. In diesem Fall konnte zwar die Struktur und putative biologische Aktivität (Fe(III)-Chelatisierung) vorhergesagt werden, jedoch erfolgte die Identifizierung des Siderophors anhand eines Vergleichs des Metabolitprofils zwischen dem Wildtyp und einem Knockout-Stamm.

Die gezeigten Beispiele verdeutlichen das große Potential und die Praktikabilität der entwickelten Konzepte des Genomischen Minings und sollten eine rationale Suche nach neuen Leitstrukturen in der Zukunft erlauben.

1.3 Ribosomale und nichtribosomale Peptide

Neben Alkaloiden, Kohlenhydraten, Terpenen, Polyketiden, Fettsäuren und Lipiden stellen Peptide eine große und pharmakologisch interessante Klasse innerhalb des heterogenen chemischen Strukturraums der Naturstoffe dar. Chemisch handelt es sich um Biopolymere aus kondensierten Aminosäuren (AS), wobei eine Vielzahl von Modifizierungen zu einer großen Strukturdiversität führt. Trotz dieses einfachen Grundaufbaus hat die Natur zwei unabhängige Biosynthesewege für diese Naturstoffe entwickelt [18]. Man unterscheidet dabei zwischen den ribosomalen Peptiden (RP), bei denen das Polypeptidgerüst durch das Ribosom anhand eines mRNA-Templats synthetisiert wird [19], und den nichtribosomalen Peptiden (NRP), die mit Hilfe von multimodular aufgebauten Enzymkomplexen, den nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), assembliert werden (Abbildung 1.2) [20,21]. Der Hauptunterschied beider Biosynthesewege besteht darin, dass ribosomale Peptide aufgrund der mRNA-vermittelten Synthese auf den Einbau der 20 proteinogenen Aminosäuren limitiert sind, während nichtribosomale Peptide durch die vom Ribosom unabhängige enzymatische Assemblierung eine Vielzahl von Monomeren integrieren können. So wurden bisher mehr als 500 Monomere in NRPs beschrieben, darunter nicht-proteinogene Aminosäuren, Fettsäuren und α -Hydroxysäuren [22]. Diese Diversität der Monomere liefert einen wichtigen Beitrag zur Strukturvielfalt der NRPs und ist entscheidend für ihre biologische Aktivität. So wird beispielsweise durch die Verwendung nicht-proteinogener Aminosäuren eine Stabilität gegenüber proteolytischem Abbau garantiert und die hydrolytische Inaktivierung durch Proteasen im Zielorganismus verhindert. Bei ribosomalen Peptiden wird die Limitierung bei der Auswahl der Monomere durch ein breites Repertoire von posttranslationalen Modifikationen überwunden.

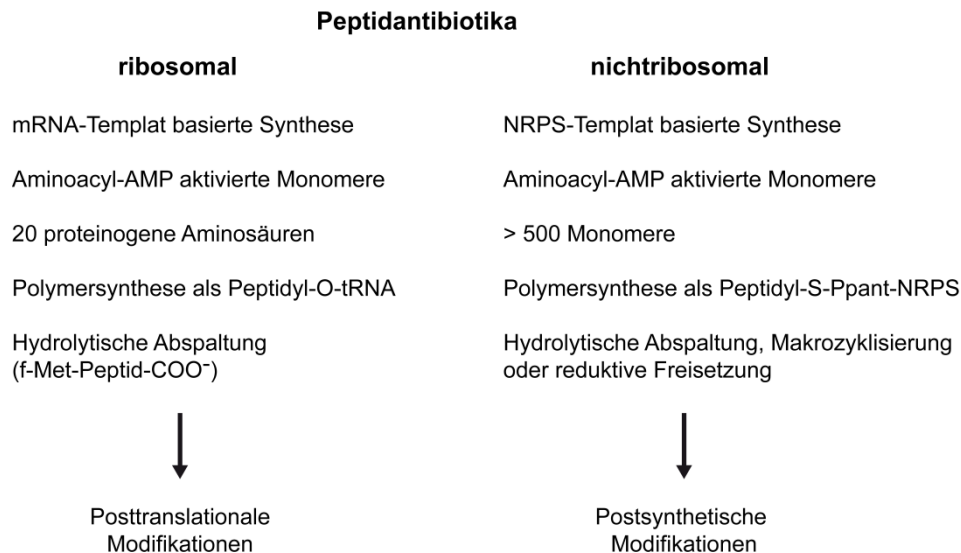


Abbildung 1.2: Vergleich von ribosomaler und nichtribosomaler Peptidsynthese.

1.4 Allgemeines Prinzip der Biosynthese ribosomaler Peptide

Die Biosynthese ribosomaler Peptide folgt einem allgemeinen Prinzip. Sie beginnt mit der Transkription eines Vorläufers in die korrespondierende mRNA, die anschließend durch das Ribosom in das Vorläuferprotein translatiert wird. Dieses Vorläuferprotein ist aufgrund seines ribosomalen Ursprungs aus den 20 proteinogenen Aminosäuren aufgebaut und kann in bis zu vier unterschiedliche Segmente unterteilt werden. Allen Vorläuferproteinen gemein ist die Präsenz eines N-terminalen Leaderpeptids und eines C-terminalen Kernpeptids (Abbildung 1.3). Zusätzlich kann am N-Terminus des Leaderpeptids ein Signalpeptid zur Steuerung der subzellulären Lokalisierung in Eukaryoten und eine Erkennungssequenz C-terminal zum Kernpeptid vorhanden sein. Das Kernpeptid entspricht dem Segment des Vorläuferproteins, das in das finale Produkt konvertiert wird. Die Funktion des Leaderpeptids unterscheidet sich für verschiedene Klassen ribosomaler Peptidantibiotika, wobei folgende Rollen in der aktuellen Literatur diskutiert werden [23]: (I) Das Leaderpeptid stellt ein Sekretionssignal dar und vermittelt damit den Transport durch Membranen. (II) Es dient als Erkennungsmotiv für die posttranslationalen Reifungsenzyme. (III) Das Leaderpeptid dient als intramolekulares Chaperon und assistiert damit bei der Faltung und Konversion in das gereifte Peptid. (IV) Es verleiht einen Schutz gegenüber proteolytischem Abbau und erhöht damit die intrazelluläre Halbwertszeit. (V) Das Leaderpeptid führt zu einer Inaktivierung und damit zu einer Selbstimmunität bis zum Zeitpunkt der Proteolyse und des Exports.

Im Anschluss an die Biosynthese des Vorläuferproteins schließen sich sämtliche posttranslationale Modifikationen des Kernpeptids an (siehe Abschnitt 1.5). Darüber hinaus erfolgen die proteolytische Abspaltung des Kernpeptidsegments vom Rest des Vorläuferproteins und der Transport des gereiften Peptids.

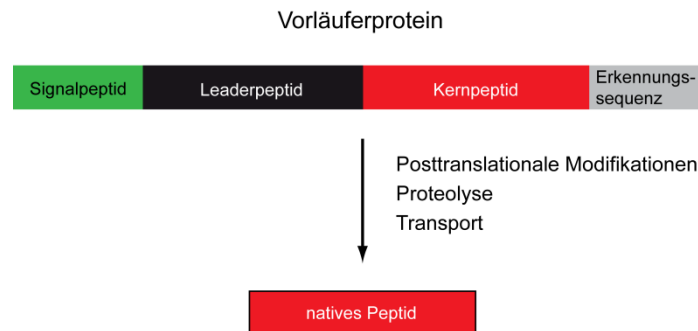


Abbildung 1.3: Schema zur Biosynthese eines ribosomalen Peptids aus dem Vorläuferprotein.

1.5 Posttranslationale Modifikationen ribosomaler Peptide

Trotz oder gerade wegen der Limitierung auf die 20 proteinogenen Aminosäuren in ribosomalen Peptiden hat sich im Laufe der Evolution eine zu den nichtribosomalen Peptiden analoge strukturelle Diversität entwickelt, die durch intensive posttranslationale Modifikationen des Peptidgerüsts realisiert wird. Diese posttranslationalen Modifikationen können in Modifikationen der Aminosäureseitenketten und des Peptidrückgrats unterteilt werden (Tabelle 1.1).

Bei den Seitenkettenmodifikationen findet man Dehydratisierungen von Ser oder Thr unter der Bildung von 2,3-Didehydroalanin bzw. (Z)-2,3-Didehydrobutyrin. Diese dehydratisierten Aminosäuren sind in allen Klassen der Lantibiotika zu finden und reagieren häufig intramolekular mit Cysteinen unter Ausbildung der charakteristischen Lanthionmotive [24]. Neben der Dehydratisierung sind Heterozyklisierungen von Cys, Ser oder Thr in ribosomalen Peptiden häufig vertreten. Diese Heterozyklen resultieren aus einem nukleophilen Angriff des Seitenkettenthiois oder -hydroxyls auf den Carbonylkohlenstoff der N-terminal benachbarten Aminosäure und führen zur Ausbildung von Thiazolin, Oxazolin bzw. Methyloxazolin, die durch Oxidation der C α -C β -Bindung in Thiazol, Oxazol bzw. Methyloxazol überführt werden können [19]. Beispiele für ribosomale Peptide mit heterozyklischen Strukturen sind Microcin B17 [25] und die Cyanobactine [26]. Darüber hinaus ist die Addition von Isopreneinheiten eine Strategie zur Seitenkettenderivatisierung, wie die Farnesylierung oder Geranylierung eines hochkonservierten Tryptophanrestes in ComX Signalpeptiden zeigt [27]. Eine weit verbreitete Modifikation ist die Ausbildung von Disulfidbrücken, also die Oxidation zweier Cysteinreste unter Ausbildung einer S-S-Bindung, die die Peptide in eine biologisch aktive Konfiguration zwingt [28]. Die Conopeptide aus Meeresschnecken der Gattung *Conus* [29], die Cyclotide aus Pflanzen [30] und die antimikrobiellen Defensine [31] sind Beispiele für ribosomale Peptide mit Disulfidmotiven. Eine bisher einzigartige Seitenkettenmodifikation ist die Ausbildung von Thioethern zwischen Cysteinen und α -C Atomen im zirkulären Peptidantibiotikum Subtilisin A aus *Bacillus subtilis* [32].

Modifikationen des Peptidrückgrats stellen eine weitere Strategie zur Strukturdiversifizierung ribosomaler Peptide dar. Die einfachste und sehr häufig vorhandene Modifikation ist dabei die Proteolyse, bei der das Kernpeptid aus dem Vorläuferprotein generiert wird [23]. Darüber hinaus sind Makrozyklisierungen unter Bildung von makrozyklischen bzw. verzweigt-zyklischen Laktamen eine häufig beobachtete Modifikation, die bei allen zirkulären Bacteriocinen [33], Cyclotiden [34],

Θ-Defensinen [35] und Lassozeptiden [36] beobachtet wird. Die Nukleotidaddition im Falle des Microcins C7 [37], Makrothiolacton- oder Makrolactonbildung beim Autoinduzierten Peptid [38] bzw. bei Microviridin [39], sowie Glykosylierung bei Microcin E492m [40] sind dagegen spezifisch für diese Vertreter und wurden bisher nicht in anderen ribosomalen Peptiden beobachtet.

Tabelle 1.1: Übersicht posttranslationaler Modifikationen ribosomaler Peptide.

posttranslationale Modifikation	Aminosäuren	Naturstoff	Referenz
Seitenkettenmodifikation			
Dehydratisierung	Ser, Thr	Lantibiotika (Nisin, Subtilin)	[24]
Lanthioninbildung	2,3-Didehydroalanin, (Z)-2,3-Didehydrobutyrin; Cystein	Lantibiotika (Nisin, Lacticin)	[24]
Heterozyklisierung	Cys, Ser, Thr	Microcin B17 Patellamid A	[25] [41]
Prenylierung	Trp	ComX	[27]
Disulfidbindung	Cys	Conopeptide Cyclotide Defensine	[29] [30] [31]
Thioetherbildung mit Cα	Cys	Subtilosin A	[32]
Peptidrückgratmodifikation			
Proteolyse	verschiedene	beinahe alle RPs	[23]
Makrozyklisierung (Makrolaktambildung)	N- und C-Terminus	circulare Bacteriocine	[33]
		Cyclotide	[34]
		Θ-Defensine	[35]
	N-Terminus und Asp, Glu	Lassopeptide	[36]
Nukleotidaddition	Asp (α-COOH)	Microcin C7	[37]
Makro(thio)lactonbildung	Ser, Thr, Cys	Autoinduziertes Peptid	[38]
		Microviridin	[39]
Glykosylierung	Ser (α-COOH)	Microcin E492m	[40]

1.6 Makrozyklische ribosomale Peptide

Makrozyklische Peptidstrukturen können prinzipiell aus Reaktionen (I) des Peptidrückgrats, (II) zwischen dem Rückgrat und einer Seitenkette oder (III) zwischen zwei Seitenketten hervorgehen. Chemisch resultieren diese Makrozyklen aus intramolekularen Reaktionen unter der Bildung eines Makrolaktams, -laktons, -thiolaktons, Lanthionins, Thioethers oder einer Disulfidbrücke. Im Folgenden soll der Schwerpunkt auf Vertretern liegen, die durch eine intramolekulare Amidbindung unter Einbeziehung des Peptidrückgrats charakterisiert sind, also zur Klasse der Makrolaktame zählen. Die Ausbildung dieser zyklischen Strukturen kann theoretisch entweder durch eine

sogenannte Kopf-zu-Schwanz (engl. head-to-tail)-Zyklisierung unter Ausbildung eines Peptids ohne erkennbaren N- oder C-Terminus [42] oder durch eine Kondensationsreaktion des N- oder C-Terminus mit einer sauren Aminosäure (Asp oder Glu) bzw. einem Lysinrest erfolgen (Abbildung 1.4). Die ersten beiden Möglichkeiten sind in verschiedenen ribosomalen Peptiden realisiert, wohingegen die Ausbildung einer Makrolaktamstruktur zwischen der ϵ -NH₂-Gruppe eines Lysins und der C-terminalen Carboxylgruppe bisher nicht beobachtet wurde.

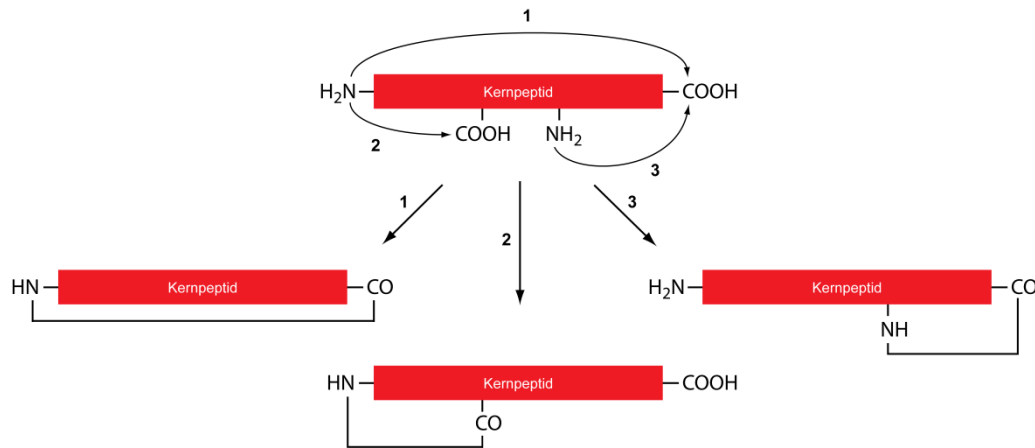


Abbildung 1.4: Mögliche Makrozyklisierungsstrategien unter Bildung eines Makrolaktams und Einbeziehung des Peptidrückgrats bei ribosomalen Peptiden. Makrolaktame können aus einer Kondensationsreaktion zwischen der N-terminalen α -NH₂-Gruppe und C-terminalen Carboxylgruppe (1), der N-terminalen α -NH₂-Gruppe und einer Seitenkettencarboxylgruppe eines Aspartats/Glutamats (2) oder einer ϵ -NH₂-Gruppe eines Lysins und der C-terminalen Carboxylgruppe (3) hergehen. Strategie 3 wurde bei ribosomalen Peptiden bisher nicht beobachtet.

1.6.1 Zirkuläre Bacteriocine

Bacteriocine werden als ribosomal synthetisierte Peptidantibiotika definiert, die von Bakterien produziert und in den extrazellulären Raum sekretiert werden, wo sie das Wachstum kompetitiver Bakterien hemmen. Gemäß einer neuen Klassifizierung der Bacteriocine nach Heng und Tagg [43] werden die zirkulären Bacteriocine in der Klasse IV zusammengefasst. Sie zeichnen sich durch eine head-to-tail-Zyklisierung aus, bei der die α -NH₂-Gruppe der N-terminalen Aminosäure des Kernpeptids mit der α -Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure unter Ausbildung einer Peptidbindung reagiert. Diese Verknüpfung des N- und C-Terminus führt zu einer signifikanten Verringerung der konformationellen Entropie der zuvor flexiblen linearen Peptide und damit zur Stabilisierung der bioaktiven Konformation. Ferner resultiert daraus eine Resistenz gegenüber Proteolyse durch Exoproteasen. Neben der Ausbildung dieser makrozyklischen Struktur weisen zirkuläre Bacteriocine keine weiteren posttranslationalen Modifikationen auf. Die bislang beschriebenen 9 Vertreter wurden ausschließlich aus grampositiven Bakterien isoliert (Tabelle 1.2) und variieren in der Länge zwischen 35 (Subtilosin A) und 78 AS (Uberolysin). Die Länge des jeweiligen Leaderpeptids reicht von 3 AS beim Uberolysinvorläufer bis 35 AS im Falle des AS-48.

Tabelle 1.2: Zirkuläre Bacteriocine aus grampositiven Bakterien.

Bacteriocin	Bakterienstamm	Anzahl AS des Leaderpeptids	Anzahl AS des Bacteriocins	Referenz
Acidocin B	<i>Lactobacillus acidophilus</i> M46	33	58	[44]
AS-48	<i>Enterococcus faecalis</i> S-48	35	70	[45]
Butyrivibriocin AR10	<i>Butyrivibrium fibrisolvens</i> AR10	22	58	[46]
Carnocyclin A	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	4	60	[47]
Circularin A	<i>Clostridium beijerinckii</i> ATCC 25752	6	69	[48]
Gassericin A ¹	<i>Lactobacillus gasseri</i> LA39	33	58	[49]
Reutericin 6 ¹	<i>Lactobacillus reuteri</i> LA6	33	58	[50]
Uberolysin	<i>Streptococcus uberis</i> 42	3	78	[51]
Subtilosin A	<i>Bacillus subtilis</i>	8	35	[52]

¹ Gassericin A und Reutericin 6 wurden kürzlich als chemisch identisch identifiziert [53]

Bisher konnte die Biosynthese der zirkulären Bacteriocine aufgrund fehlender *in vitro* Charakterisierung der Modifikationsenzyme nicht aufgeklärt werden, aber die finale Struktur der Peptide impliziert ihren Ablauf. Im ersten Schritt der Biosynthese muss das Nukleophil (N-Terminus des Kernpeptids) durch proteolytische Abspaltung des Leaderpeptids freigesetzt werden. In der nachfolgenden Kondensationsreaktion reagiert die freigesetzte α -Aminogruppe mit der C-terminalen Carboxylgruppe unter Bildung des Makrolaktams. Die Ausbildung einer Amidbindung zwischen einer Säurefunktion und einem primären Amin erfordert jedoch unter den intrazellulären Bedingungen eine Aktivierung der Carboxylgruppe. Bislang ist unklar, welcher Art diese Aktivierung bei der Synthese der zirkulären Bacteriocine ist.

Eine Sonderstellung innerhalb der zirkulären Bacteriocine nimmt das Subtilosin A aus *Bacillus subtilis* ein, da es der einzige Vertreter ist, der neben der Makrolaktambildung weitere posttranslationale Modifikationen aufweist. Subtilosin A zeichnet sich zusätzlich durch drei Thioetherbrücken zwischen den Thiolfunktionen der Cysteine an den Positionen 4, 7 und 13 sowie den α -Kohlenstoffatomen der Aminosäuren Phe22, Thr28 und Phe31 aus, die einzigartig innerhalb der Klasse der ribosomalen Peptidantibiotika sind (Abbildung 1.5).

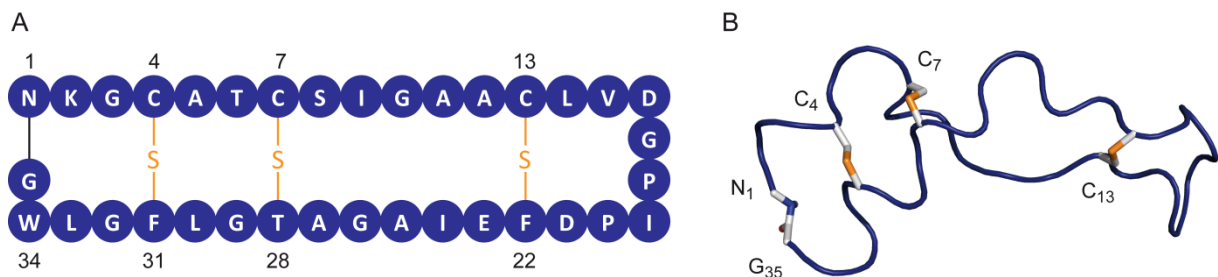


Abbildung 1.5: Struktur von Subtilosin A. (A) Schematische Darstellung von Subtilosin A. Die zur makrozyklischen Struktur führende Peptidbindung zwischen Asn1 und Gly35 ist als schwarzer Strich und die drei Thioetherbindungen sind in orange dargestellt. (B) NMR-Struktur von Subtilosin A (PDB 1PXQ). Das Peptidrückgrat ist als blauer Cartoon gezeigt. Die Peptidbindung Asn1-Gly35 sowie die Thioetherbindungen sind als Stabmodell mit einer elementspezifischen Farbgebung (C: grau, N: blau, O: rot, S: orange) hervorgehoben.

Im Falle des Subtilosins A wird spekuliert, dass für die Einführung der Thioetherbrücken das *albA*-Genprodukt verantwortlich ist, das Homologie zu Vertretern der Radikal-SAM-Superfamilie zeigt, der beispielsweise die Biotin Synthase angehört [54]. Proteinen dieser Familie ist ein CxxxCxxC Motiv gemein, das für die Bindung eines [4Fe-4S]-Clusters notwendig ist. Radikal-SAM-Proteine spalten nach der Bindung von SAM den [4Fe-4S]⁺-SAM-Komplex in einen [4Fe-4S]²⁺-Met-Komplex und ein 5'-Desoxyadenosylradikal, das anschließend ein Wasserstoffatom vom Substrat abstrahiert und somit einen Radikalmechanismus initiiert [55,56]. Für die Bildung des Makrozyklus wird dagegen eine Rolle der beiden putativen Proteasen AlbE und AlbF diskutiert, von denen eine vermutlich das Leaderpeptid proteolytisch abspaltet und die andere die Peptidbindungsbildung katalysiert (Abbildung 1.6), analog zu den in der Peptidsynthese Anwendung findenden Proteasen [57].

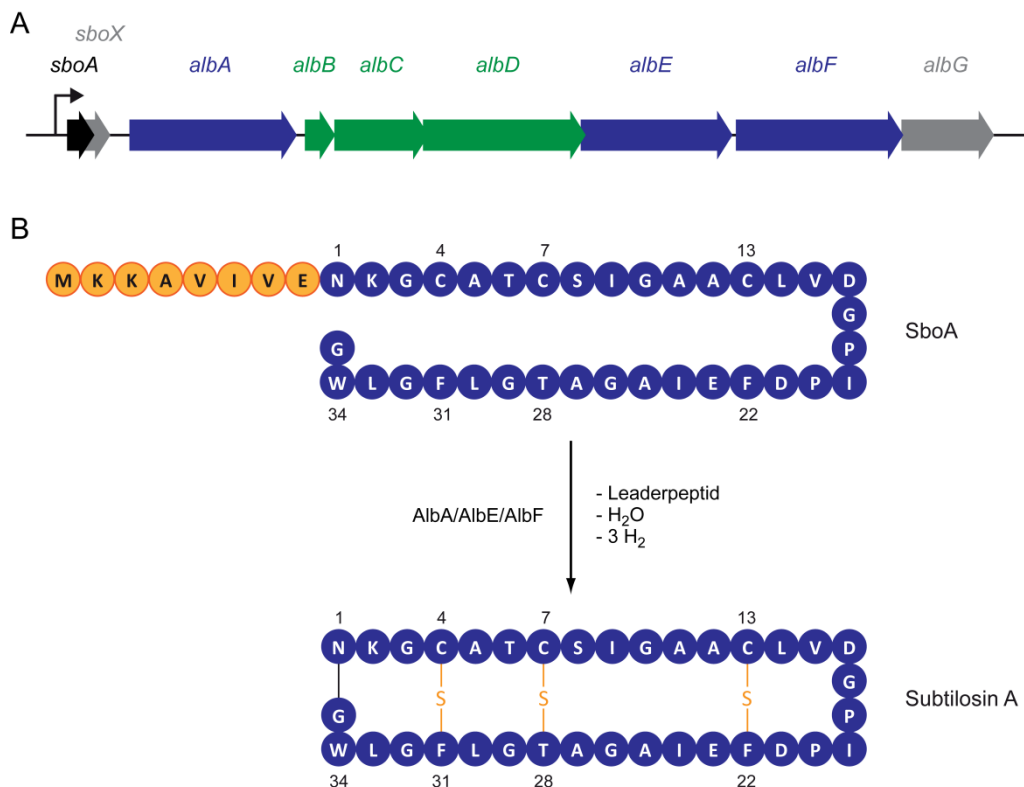


Abbildung 1.6: Biosynthesegencluster und schematische Darstellung der putativen Biosynthese von Subtilosin A. (A) Biosynthesegencluster von Subtilosin A. Gene, die für prozessierende Enzyme kodieren, sind in blau, das Vorläufergen in schwarz und Gene für Selbstimmunität in grün dargestellt. Gene unbekannter Funktion sind grau markiert. (B) Putative Biosynthese. Das 43-AS Vorläuferpeptid SboA wird in das lineare Subtilosin A und das Leaderpeptid gespalten. Die freigesetzte α -NH₂-Gruppe des Asn1 reagiert anschließend in einer Kondensationsreaktion mit der C-terminalen Carboxylgruppe des Gly35 unter Ausbildung des zyklischen Subtilosins A, das durch Einführung der 3 Thioetherbindungen in das native Subtilosin A überführt wird. Die drei Reifungsreaktionen werden vermutlich von AlbA, AlbE und AlbF katalysiert.

Subtilosin A wurde bereits 1985 isoliert [52] und besitzt sowohl gegen grampositive als auch gegen gramnegative Bakterien eine inhibitorische Wirkung [58]. Dabei interagiert Subtilosin A mit der bakteriellen Zellmembran, indem es durch Bindung an die polare Region der Lipiddoppelschicht

konformationelle Änderungen in der hydrophoben Region induziert, die zu einer Permeabilisierung führen [59]. Darüber hinaus zeigt Subtilisin A eine spermizide Wirkung [60] und wird aufgrund seiner Aktivität gegenüber *Gardnerella vaginalis* als Prophylaktikum gegen bakterielle Vaginose diskutiert [61].

1.6.2 Cyanobactine

Cyanobactine sind makrozyklische ribosomale Peptide aus frei lebenden oder endosymbiontischen Cyanobakterien, die sich aus 6, 8 bzw. 11 Aminosäuren zusammensetzen [62,63]. Darüber hinaus enthalten sie bis zu vier Heterozyklen (Abbildung 1.7). Die am besten untersuchten Vertreter dieser Klasse ribosomaler Peptide sind die cytotoxischen Patellamide A-C [64], die von dem Endosymbionten *Prochloron didemni* der Seescheide *Lissoclinum patella* produziert werden [65]. Das Vorläuferprotein der Patellamide PatE enthält ein N-terminales Leaderpeptid sowie zwei Kernpeptidsequenzen aus acht Aminosäuren, die jeweils von ähnlichen Tetrapeptidsequenzen flankiert werden. Die Reifung dieser Kernpeptidsequenzen umfasst zwei Proteolyseschritte, die Makrozyklisierung und die Einführung der vier heterozyklischen Ringsysteme. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass das *patG*-Genprodukt des *patABCDEFGG*-Genclusters für die Spaltung der Peptidbindung C-terminal zum Kernpeptid verantwortlich ist und anschließend die makrozyklische Kondensation katalysiert [66]. Laut Sequenzalignments ist PatG vermutlich eine Serinprotease mit der charakteristischen katalytischen Triade Ser544-His614-Asp779. Die Spaltung der Peptidbindung C-terminal zum Kernpeptid (N-terminal zur AYDG-Tetrapeptidsequenz) führt dabei zur Bildung eines Acyl-Enzym-Intermediats, bei der das Peptid als Oxoester an PatG gebunden und der C-Terminus aktiviert ist. Dieser Ester wird im Anschluss nicht wie im Falle einer Protease unter Verwendung von H₂O als Nukleophil hydrolysiert, sondern der nukleophile Angriff der α -Aminogruppe des Kernpeptids führt zur Regenerierung des Enzyms unter Bildung des Makrolaktams. Die Makrozyklisierung der Cyanobactine kann daher chemisch als Transamidierung verstanden werden. Besonders hervorzuheben ist, dass für die Zyklisierung eine breite Substratspezifität beobachtet wurde, da PatG mehr als 30 unterschiedliche Oktapeptidsequenzen zyklisierte, sofern die C-terminale AYDG-Tetrapeptiderkennungssequenz präsent war. Desweiteren wurde experimentell gezeigt, dass PatA für die Spaltung der Peptidbindung N-terminal zu den Kernpeptidsequenzen verantwortlich ist. Bei der Einführung der Heterozyklen wird eine Rolle von PatD diskutiert [67]. Interessanterweise wurden bei einem PCR-basierten Screening nach *patE*-Genen in *Prochloron*-Spezies aus 46 Seescheidenproben des tropischen Pazifiks mehr als 20 PatE-Varianten gefunden, die lediglich in der Kernpeptidregion variierten [68]. Es ist also anzunehmen, dass durch Punktmutationen innerhalb dieses Kernpeptids eine natürliche Biobibliothek von Cyanobactinen entstanden ist. Somit kann eine Seescheide bei einer Symbiose mit verschiedenen Cyanobakterien über ein breites Arsenal dieser makrozyklischen Peptide verfügen.

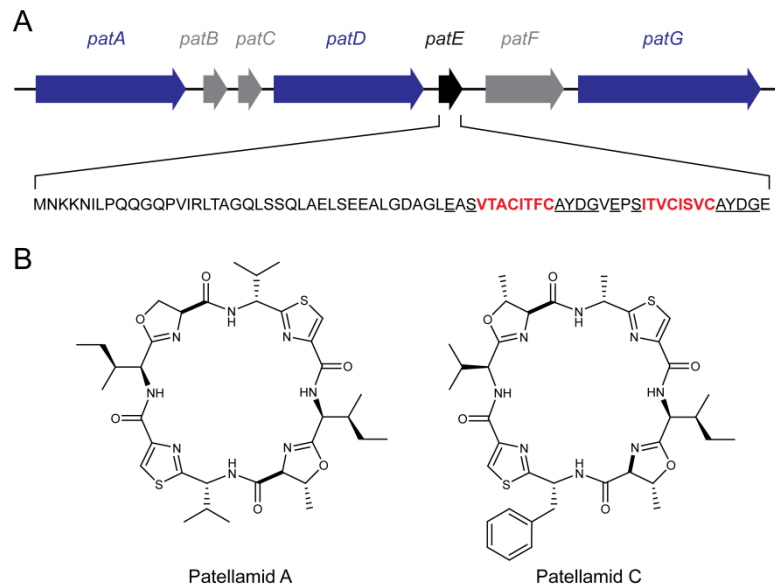


Abbildung 1.7: Patellamide. (A) Biosynthesegencluster der Patellamide. Gene von prozessierenden Enzymen sind in blau, das Vorläufergen in schwarz und Gene für Proteine unbekannter Funktion in grau dargestellt. Die Kernpeptidsequenzen innerhalb von PatE, die für Patellamid A und Patellamid C kodieren, sind rot hervorgehoben. Konservierte Aminosäuren in den N- und C-terminal flankierenden Bereichen sind unterstrichen. (B) Chemische Strukturformeln von Patellamid A und Patellamid C.

1.6.3 Amatoxine und Phallotoxine

Neben den bisher vorgestellten Makrolaktamen aus Bakterien wurde kürzlich auch der ribosomale Ursprung der Amatoxine und Phallotoxine aufgeklärt [69], die für die Toxizität der Pilze aus der Gattung *Amanita* verantwortlich sind. Dabei beruht die toxische Wirkung der Amatoxine auf der Inhibition der RNA-Polymerase II [70], während die Phallotoxine zu einer Stabilisierung des F-Actins führen [71]. Chemisch betrachtet stellen Amatoxine und Phallotoxine bizyklische Peptide aus acht bzw. sieben L-Aminosäuren dar, die neben der Makrolaktamstruktur eine Thioetherbrücke zwischen der Thiofunktion eines Cysteins und dem C2-Kohlenstoff der Indolseitenkette eines Tryptophans aufweisen, die bei den Amatoxinen zum Sulfoxid oxidiert ist [69]. Außerdem sind die Seitenketten zum Teil hydroxyliert (Abbildung 1.8). Zur Untersuchung des biosynthetischen Ursprungs der fungalen Toxine wurde das Genom von *A. bisporigera*, einem Amatoxin- und Phallotoxinproduzenten aus Nordamerika, sequenziert und dabei Vorläufergene sowohl für das Amatoxin α -Amantin als auch für das Phallotoxin Phallacidin identifiziert [72]. Diese Vorläufergene enthalten ein N-terminales Leaderpeptid, das Kernpeptid und eine C-terminale Region. Hervorzuheben ist, dass die C-terminale AS des Leaderpeptids und die C-terminale AS des Kernpeptids jeweils ein Prolin darstellen, so dass die zu spaltenden Peptidbindungen jeweils ein Prolin an der P1-Position enthalten. Demzufolge wird eine entscheidende Rolle einer Prolylendopeptidase bei der Reifung der Peptide angenommen. Die flankierenden Bereiche des Kernpeptids weisen einen hohen Grad an Konservierung auf, während die Kernpeptide hypervariable Bereiche darstellen, wie ein Vergleich mit anderen Vorläufergenen zeigte [72]. Das Konzept mittels hypervariabler Bereiche innerhalb konservierter Vorläuferproteine

eine chemische Bibliothek zyklischer Peptide zu generieren, trifft also neben den Cyanobactinen auch auf die Amatoxine und Phallotoxine zu.

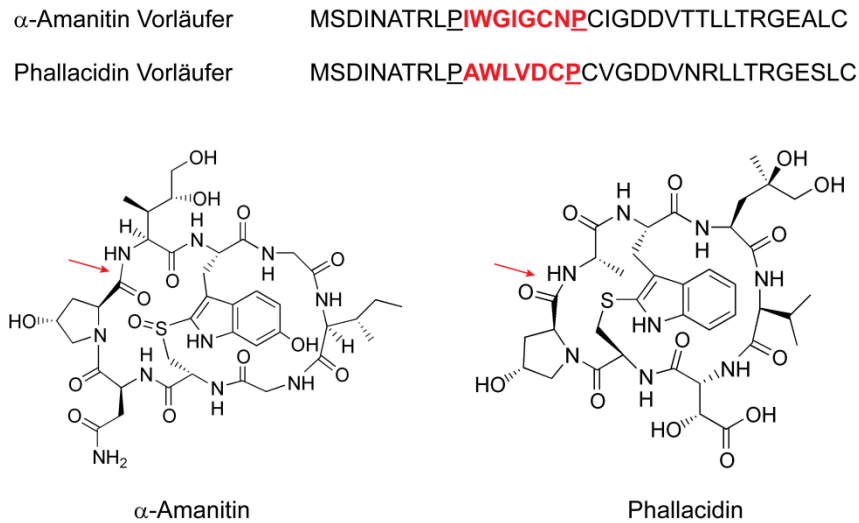


Abbildung 1.8: Amatoxine und Phallotoxine. cDNA basierte Vorläuferproteine von α -Amanitin und Phallacidin. Die Kernpeptidsequenzen sind in rot hervorgehoben und die beiden Prolinreste am C-Terminus des Leaderpeptids und des Kernpeptids sind unterstrichen. Die bei der Zyklisierung neu zu bildende Amidbindung ist in den Strukturformeln mit einem roten Pfeil markiert.

1.6.4 Cyclotide

Makrozyklische ribosomale Peptide wurden nicht nur in Bakterien und Pilzen, sondern auch in Pflanzen nachgewiesen. Die aus den Pflanzenfamilien *Violaceae*, *Rubiaceae* und *Cucurbitaceae* isolierten Cyclotide setzen sich aus 28 – 37 AS zusammen und besitzen neben der makrozyklischen Laktamstruktur drei Disulfidbrücken, die durch 6 hochkonservierte Cysteine gebildet werden [34]. Diese liegen in einer verknoteten Anordnung vor und werden daher als CCK-Motiv (engl. cyclic cysteine knot) bezeichnet, das als Charakteristikum für diese Klasse von makrozyklischen Peptiden gilt. Dabei bilden zwei Disulfidbrücken zusammen mit dem Peptidrückgrat einen Zyklus, durch den die dritte Disulfidbindung hindurchragt. Die Vorläuferproteine von Cyclotiden stimmen in ihrer Organisation mit dem bereits beschriebenen typischen Aufbau überein. Sie verfügen über eine N-terminale Signalsequenz für das Endoplasmatische Retikulum (ER), ein Leaderpeptid und eine oder mehrere Kopien des Kernpeptids, vor denen sich jeweils repetitive Sequenzen, sogenannte N-terminale Repeats (NTR), befinden (Abbildung 1.9). Darüber hinaus liegt am C-Terminus eine kurze hydrophobe Sequenz vor [73]. Ein ribosomaler Vorläufer kann daher als Edukt zur Biosynthese mehrerer und auch unterschiedlicher Cyclotide dienen. Anhand der Sequenzen von mehr als 140 isolierten Cyclotiden [74] in Kombination mit der wachsenden Zahl von Nukleinsäuresequenzen, die für Cyclotidvorläuferproteine kodieren [75], kann ein Modell der biosynthetischen Reifung aus den Vorläuferproteinen postuliert werden. Es scheint, dass Pflanzen keine neue enzymatische Infrastruktur zur Prozessierung entwickelt haben. Stattdessen verwenden Cyclotid-produzierende Pflanzen ubiquitär vorhandene Asparaginyl-Endoproteasen, die normalerweise Peptidbindungen

C-terminal von Aspartat oder Asparagin spalten, um mit der Makrozyklisierung die zur Hydrolyse reverse Reaktion zu katalysieren [76,77]. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch die Tatsache, dass alle bekannten Vorläuferproteinsequenzen über ein Asp/Asn am C-Terminus des Kernpeptids verfügen. Darüber hinaus wird die Omnipräsenz des Biosyntheseapparats dadurch unterstrichen, dass die Einführung des Kalata B1 Vorläufers in nicht produzierende Pflanzen wie beispielsweise Tabak (*Nicotiana tabacum*) zur Produktion von Kalata B1 ausreichend ist [77].

Die zweite Reifungsreaktion besteht in der Ausbildung der 3 Disulfidbrücken zum charakteristischen CCK-Motiv. Für diese Aufgabe wurden Protein-Disulfid-Isomerasen diskutiert, die bei der Faltung von disulfidreichen Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum von Eukaryoten assistieren [78]. *In vitro* Studien einer Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) aus *Oldenlandia affinis* bestätigten diese Annahme, da die PDI sowohl die Faltungsrate als auch die –ausbeute verbesserte [79,80].

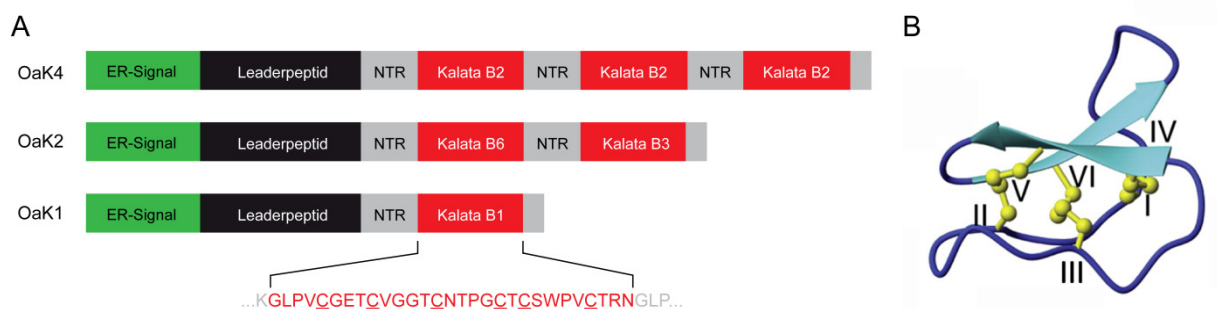


Abbildung 1.9: Cyclotide. (A) Aufbau der Vorläuferproteine der Cyclotide Kalata B1, B2, B3 und B6. Die Vorläuferproteine enthalten ein Signalpeptid für das Endoplasmatische Retikulum (grün), ein Leaderpeptid (schwarz) sowie die Kernpeptidsequenzen (rot), die von repetitiven Sequenzen (grau) flankiert sind. In der Kernpeptidsequenz von Kalata B1 sind die sechs konservierten Cysteinreste unterstrichen. (B) NMR-Struktur von Kalata B1 (PDB 1NB1). Die drei Disulfidbrücken des CCK-Motivs sind in gelb dargestellt und gemäß ihrer Position innerhalb der Primärstruktur nummeriert.

Cyclotide zeigen eine Vielzahl biologischer Aktivitäten, die von einer anti-HIV über eine antimikrobielle bis hin zu einer insektiziden Wirkung reichen, so dass sie als pflanzliche Verteidigungspeptide aufzufassen sind [81]. Ihre Bioaktivität basiert vermutlich auf einer Interaktion mit Membranen. Es wird davon ausgegangen, dass Cyclotide über ein hydrophobes Patch mit der Membranoberfläche interagieren und nach lateraler Diffusion oligomerisieren. Diese Oligomere sind in der Lage, Poren zu bilden und somit die Membran zu permeabilisieren [82].

Aufgrund der hohen Stabilität gegenüber Temperatur, chemischen Denaturierungsmitteln und Proteasen [83] wurden Cyclotide als stabile Peptidgerüste zur Präsentation von pharmakologisch aktiven Epitopen diskutiert und auch bereits angewendet [73]. Bei diesem sogenannten Epitop Grafting Konzept werden bekannte oder beispielsweise durch Phage Display identifizierte bioaktive Peptidepitope in die Schleifenbereiche des Cyclotidgerüsts inseriert (Abbildung 1.10). Dadurch können neue biologische Funktionen eingeführt und mit den Vorteilen des stabilen Cyclotidgerüsts kombiniert werden [84]. Die Insertion des RRKRRR-Epitops, das für die Bindung an den Rezeptor des vaskulären, endothelialen Wachstumsfaktors (engl. vascular endothelial growth factor receptor,

VEGFR) entscheidend ist, in die Schleife 5 des Cyclotids Kalata B1 resultierte in einem VEGFR-Antagonisten mit mikromolarer Affinität und zeigte das Potential des CCK-Gerüsts zur stabilen Pharmakophorpräsentation.

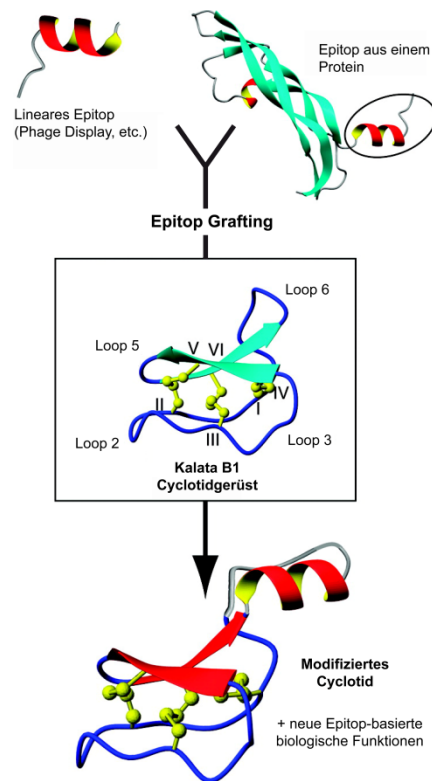


Abbildung 1.10: Epitop Grafting Konzept. Bioaktive Epitope, die aus einem Protein stammen oder mittels Phage Display Experimenten identifiziert wurden, werden in die großen Schleifenbereiche des stabilen Cyclotidgerüsts insertiert. Durch die Insertion können modifizierte Cyclotide mit neuen Epitop-basierten Bioaktivitäten generiert werden [84].

1.6.5 θ -Defensine

Antibakterielle Peptide sind aus evolutionärer Sicht sehr alte Elemente der angeborenen Immunität [85]. In Wirbeltieren unterscheidet man zwischen drei Unterfamilien dieser sogenannten Defensine. Die α - und β -Defensine wurden zuerst 1985 bzw. 1991 beschrieben und stellen kationische, lineare Peptide einer Länge von 29 – 42 Aminosäuren dar, die durch drei Disulfidbrücken rigidifiziert werden und über eine breite antibakterielle Wirkung verfügen [86,87]. Das erste θ -Defensin RTD-1 wurde 1999 aus Leukocyten von Rhesusaffen isoliert [88]. Dabei handelte es sich um ein makrozyklisches Oktadekapeptid, das analog zu den α - und β -Defensinen drei Disulfidbrücken enthielt (Abbildung 1.11). Die Vorläuferproteine der θ -Defensine zeigen Homologien zu denen der α -Defensine und enthalten ein Kernpeptid aus neun Aminosäuren. Für die Reifung der θ -Defensine ist daher die Ligation zweier Nonapeptide, also im Gegensatz zu den bisher vorgestellten makrozyklischen Peptiden die Ausbildung von zwei neuen Peptidbindungen, notwendig. Interessanterweise sind Menschen trotz ihrer sehr nahen Verwandtschaft mit den Rhesusaffen mit einer 99-prozentigen Identität auf der Nukleotidebene nicht in der Lage, θ -Defensine zu synthetisieren. Die Gene für die

Vorläuferproteine sind zwar vorhanden, allerdings existiert ein Stoppcodon innerhalb des Signalpeptids, das zum frühzeitigen Abbruch der Translation führt [35]. Diese Mutation ist vermutlich bei einem gemeinsamen Vorgänger von Menschen, Schimpansen und Gorillas aufgetreten [89]. Anhand der Kernpeptidsequenzen wurden jedoch die theoretischen humanen θ -Defensine synthetisiert und als Retrocycline bezeichnet [90]. Das bisher am eingehendsten untersuchte Retrocyclin 2 zeigte eine breite antibakterielle Aktivität und konnte Zellen vor dem Eintritt von HIV [91], Herpes-Simplex- [92] und Influenza A-Viren [93] schützen, so dass in der Literatur von einem Wiedererwachen ursprünglicher Immunität gesprochen wird [94,95].

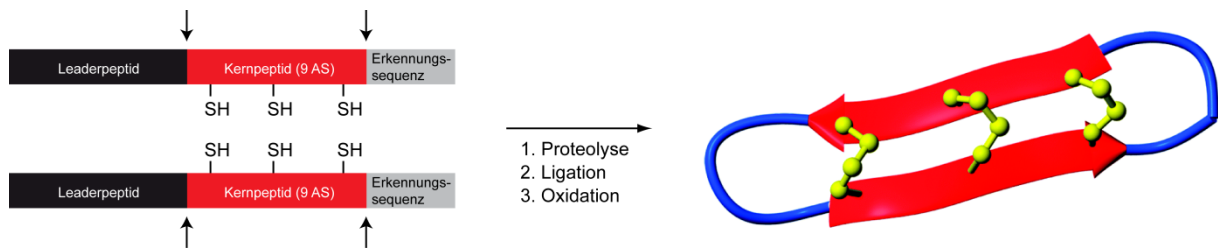


Abbildung 1.11: Postulierte Biosynthese und Struktur der θ -Defensine. θ -Defensine werden aus zwei Vorläuferproteinen durch Ligation zweier 9-AS Kernpeptidsequenzen und durch die Ausbildung von drei Disulfidbrücken generiert. Strukturell zeichnen sie sich durch ein antiparalleles β -Faltblatt und den drei in Form einer Leiter angeordneten Disulfidbrücken aus. Gezeigt ist die NMR-Struktur des Retrocyclins-2 (PDB 2ATG), eines θ -Defensins, das durch die humanen Pseudogene DEFT-1 Ψ und DEFT-4 Ψ kodiert wird [96].

1.6.6 Lasso peptide

Die bisher beschriebenen makrozyklischen ribosomalen Peptide zeichnen sich durch eine Verknüpfung des N- und C-Terminus mittels einer Amidbindung aus. Neben diesen head-to-tail zyklisierten Peptiden existieren auch verzweigt-zyklische Makrolaktame ribosomalen Ursprungs, die sogenannten Lasso peptide. Dabei handelt es sich um ribosomal assemblierte Peptide aus 16 – 21 Aminosäuren, die sowohl von grampositiven als auch gramnegativen Bakterien produziert werden [36]. Eine Kondensationsreaktion der α -NH₂-Gruppe eines N-terminalen Gly/Cys mit der Seitenkettencarboxylgruppe eines Asp/Glu an Position 8 oder 9 resultiert in einer verzweigt-zyklischen Struktur, die durch einen 8- bzw. 9-AS Makrolaktamring und einen linearen C-terminalen Schwanz charakterisiert ist (Abbildung 1.12A). Dieser lineare exozyklische C-Terminus ist allerdings nicht frei beweglich, sondern durch den N-terminalen Makrozyklus hindurch gefädelt (Abbildung 1.12B), was zur Ausbildung der charakteristischen Lassostruktur führt [97,98]. Der hindurch gefädelte C-terminale Schwanz ist dabei entweder nichtkovalent durch die sterische Hinderung voluminöser Seitenketten oder kovalent durch eine Disulfidbrücke zwischen dem C-Terminus und dem Makrozyklus innerhalb des Makrolaktamrings fixiert. Lasso peptide werden anhand der Gegenwart (Klasse I) oder Abwesenheit (Klasse II) von 4 konservierten Cysteinen, die zwei Disulfidbindungen ausbilden, klassifiziert (Abbildung 1.13) [36]. Sie setzen sich ausschließlich aus proteinogenen Aminosäuren zusammen und zeigen neben der Zyklisierung und der

Disulfidverbrückung im Falle der Klasse I-Lasso peptide keine weiteren kovalenten posttranslationalen Modifikationen.

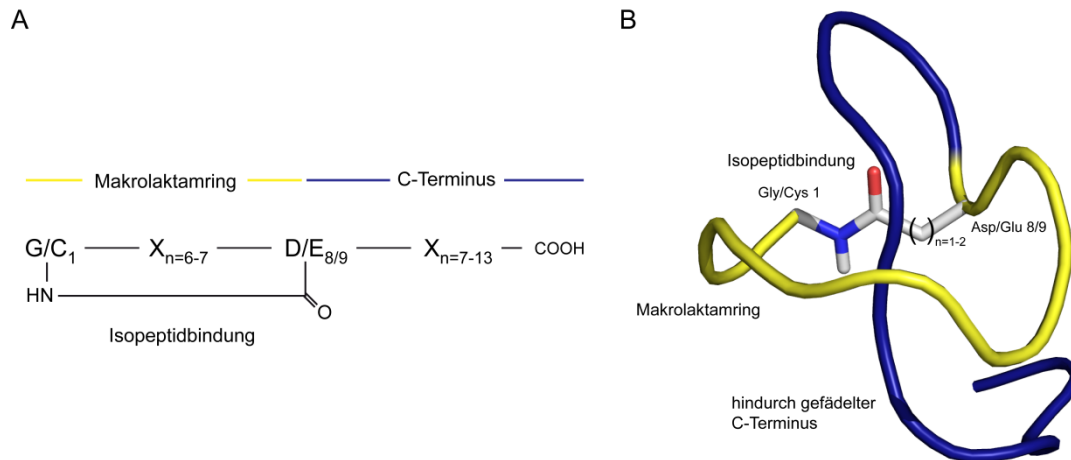


Abbildung 1.12: Lasso peptide. (A) Verzweigt-zyklische Primärstruktur von Lasso peptiden. Bei Vertretern der Klasse I liegen zusätzlich 2 Disulfidbrücken vor. (B) Dreidimensionale Struktur von Lasso peptiden. Durch eine Isoleptidbindung (Stabmodell) zwischen der α -Aminogruppe von Gly/Cys an Position 1 mit der Seitenkettencarboxylfunktion von Asp/Glu an Position 8/9 entsteht ein 8/9-AS Makrolaktamring (gelb), durch den der lineare C-Terminus (blau) hindurch gefädelt ist. Der hindurch gefädelte C-terminale Schwanz wird kovalent oder durch sterische Hinderung voluminöser Aminosäuren im N-terminalen Makrozyklus verankert und somit die charakteristische Lassotopologie stabilisiert.

1.6.6.1 Lasso peptide der Klassen I und II

Bisher sind drei Vertreter der Klasse I- und vier Vertreter der Klasse II-Lasso peptide in der Literatur beschrieben (Tabelle 1.3). Die Lasso peptide der Klasse I MS-271, RP 71955 und Siamycin II wurden ausschließlich aus *Streptomyces* isoliert und unterscheiden sich in ihrer Primärstruktur lediglich durch konservative Ile-Val Substitutionen an den Positionen 4 und 17 [99-101]. Zu MS-271 und RP 71955 identische Peptide wurden aus anderen *Streptomyces*-Stämmen isoliert und als NP-06 [102] und Siamycin I [103,104] bzw. Aborycin [105] bezeichnet. Die sehr homologen Peptide zeigen eine Vielzahl biologischer Aktivitäten, unter anderem die Inhibition der HIV-Fusion [102,106,107], Inhibition der HIV-1 Protease [100], Inhibition der MLC-Kinase (myosin light chain) [99] sowie antibakterielle Aktivität gegen grampositive Bakterien [101]. Strukturell bestehen alle aus 21 AS und besitzen einen 9-AS Makrolaktamring, der durch eine Isoleptidbindung zwischen der α -NH₂-Gruppe des Cys1 und der β -Carboxylgruppe von Asp9 gebildet wird. Der 12 Aminosäuren lange C-terminale Schwanz ist durch den N-terminalen Ring hindurch gefädelt, wobei sich die Aminosäuren 10 – 15 oberhalb und die Reste 16 – 21 unterhalb der Ringebene befinden (Abbildung 1.14A), so dass die Peptidbindung zwischen Tyr15 und Ala16 innerhalb des Makrolaktamrings positioniert ist [98,104,108]. Darüber hinaus bilden die vier Cysteine an den Positionen 1, 7, 13 und 19 zwei Disulfidbindungen, wobei jeweils ein Cysteinrest innerhalb des Makrozyklus und einer des C-terminalen Schwanzes kovalent verknüpft sind (Cys1-Cys13; Cys7-Cys19). Die stabile Verankerung des C-Terminus im N-terminalen Ring ist bei den Lasso peptiden der Klasse I vermutlich auf die

Disulfidbindung zwischen Cys7 und Cys19 zurückzuführen, die den hindurch gefädelten C-Terminus kovalent mit dem Makrozyklus verknüpft und dadurch eine Entfaltung der Lassostruktur verhindert.

Tabelle 1.3: Übersicht der bekannten Lassopeptide der Klassen I und II. Die an der Makrolaktambildung beteiligten Aminosäuren sind unterstrichen hervorgehoben.

Lassopeptid	Sequenz	Peptidlänge (Ringgröße)	Produzentenstamm	Referenz
Klasse I				
MS-271 ¹	<u>C</u> LGVGSCN <u>D</u> FAGCGYAIVCFW	21 (9)	<i>Streptomyces</i> sp.	[98]
RP 71955 ²	<u>C</u> LGIGSCN <u>D</u> FAGCGYAVVCFW	21 (9)	<i>Streptomyces</i> sp.	[108]
Siamycin II	<u>C</u> LGIGSCN <u>D</u> FAGCGYAIVCFW	21 (9)	<i>Streptomyces</i> sp.	[104]
Klasse II				
Microcin J25	<u>G</u> GAGHV <u>P</u> E <u>Y</u> FVGIGTPISFYG	21 (8)	<i>Escherichia coli</i>	[109]
RES-701-1	<u>G</u> NWHGTAP <u>D</u> WFFNYW	16 (9)	<i>Streptomyces</i> sp.	[97]
Lariat A	<u>G</u> SQLVYRE <u>W</u> VGHSNVIKP	18 (8)	<i>Rhodococcus</i> sp.	[110]
Lariat B	<u>G</u> SQLVYRE <u>W</u> VGHSNVIKGPP	20 (8)	<i>Rhodococcus</i> sp.	[110]

¹ Synonyme: NP-06 und Siamycin I; ² Synonyme: Aborycin

Die Lassopeptide der Klasse II enthalten im Gegensatz zu denen der Klasse I keine Cysteine und weisen alle ein Glycin an Position 1 auf (Abbildung 1.13). Mit Microcin J25 (MccJ25) aus *Escherichia coli* AY25 [111], RES-701-1 aus *Streptomyces* sp. RE-701 [112,113] und Lariat A und B aus *Rhodococcus* sp. K01-B0171 [110,114] sind bisher vier Vertreter beschrieben. Lariat A und B unterscheiden sich in ihrer Länge von 18 bzw. 20 Aminosäuren, stimmen jedoch nicht in der Aminosäure an Position 18 überein, weshalb eine Bildung von Lariat A durch C-terminalen proteolytischen Abbau von Lariat B auszuschließen ist. Die biologischen Aktivitäten der Klasse II-Lassopeptide reichen von Inhibition der RNA-Polymerase für MccJ25 [115,116] über antimycobakterielle Aktivität der Lariate [110] bis hin zu antagonistischer Bindung an den Endothelinrezeptor B im Falle des RES-701-1 [112].

Die Lassopeptide der Klasse II unterscheiden sich im Gegensatz zu denen der Klasse I in Größe und Verknüpfungsart des Makrolaktamrings (Tabelle 1.3). Die Primärstruktur von RES-701-1 zeichnet sich durch einen 9-AS Makrolaktamring aus, der aus einer Isopeptidbindung zwischen Gly1 und Asp9 resultiert, wohingegen MccJ25 und die Lariate einen 8-AS Makrolaktamring aufweisen, der aus der Verknüpfung von Gly1 und Glu8 hervorgeht. Alle Peptide liegen in der charakteristischen Lassostruktur vor, bei der der C-terminale Schwanz durch den Makrozyklus hindurch gefädelt ist. Da durch das Fehlen der Disulfidbindungen der hindurch gefädelt C-Terminus nicht kovalent an den Ring gebunden ist, wird er durch voluminöse Aminosäureseitenketten sterisch im Ring verankert. Im Falle des RES-701-1 wird diese Funktion von Tyr15 übernommen.

Lassopeptide besitzen durch die Kombination aus Makrolaktamring, Disulfidbrücken und der Lassotopologie eine sehr rigide Struktur (Abbildung 1.14), die ihnen trotz des Aufbaus aus proteinogenen Aminosäuren eine außerordentliche Stabilität gegenüber Endoproteasen, Aminopeptidasen sowie Temperatur und chemischen Denaturierungsmitteln verleiht [99,110] [36].

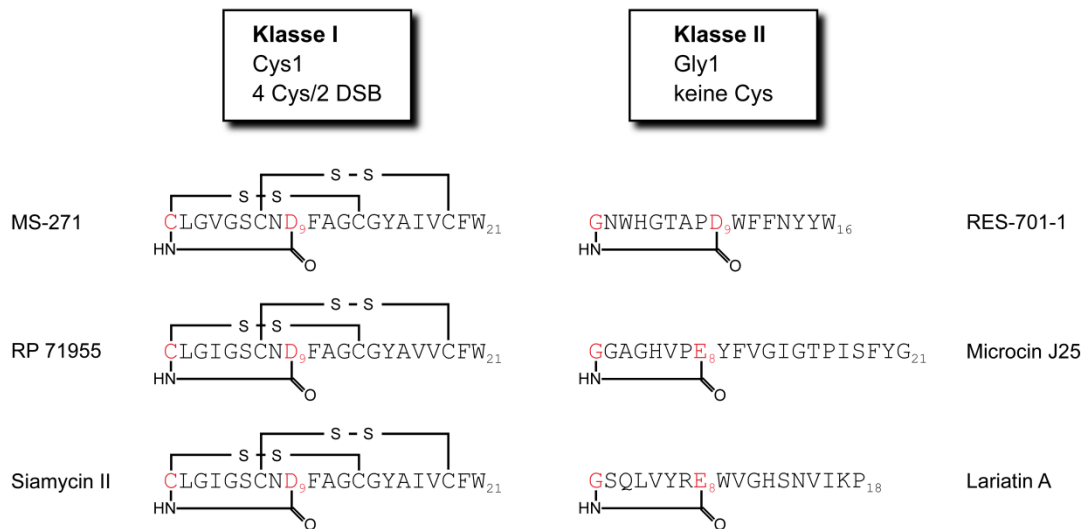


Abbildung 1.13: Klassifizierung der Lassoptide. Lassoptide der Klasse I besitzen ein Cystein an Position 1 und insgesamt 4 konservierte Cysteine, die zwei Disulfidbindungen ausbilden. Klasse II-Lassoptide sind durch ein Glycin an Position 1 charakterisiert und enthalten keine Cysteine. Die an der Makrolaktambildung beteiligten Aminosäuren sind rot hervorgehoben.

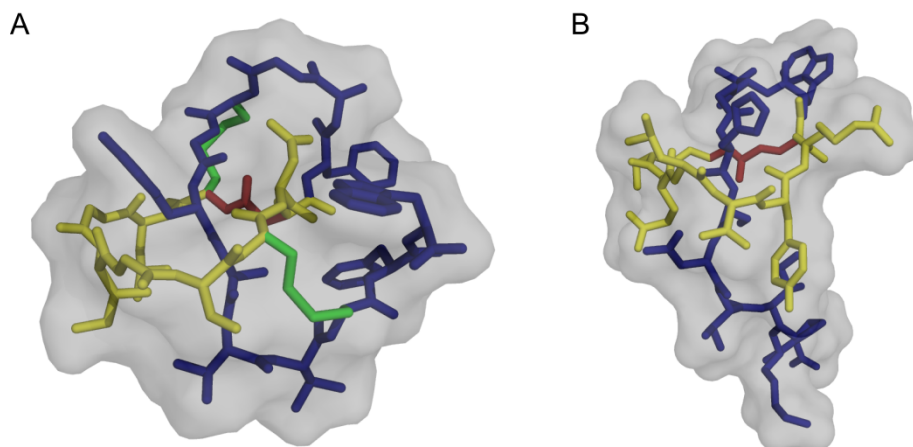


Abbildung 1.14: Strukturvergleich von Lassoptiden der Klassen I und II. (A) NMR-Struktur von RP 71955 (PDB 1RPB). (B) NMR-Struktur von Lariat A [110]. Der Makrolaktamring ist in gelb, die Isopeptidbindung in rot, der lineare C-Terminus in blau und die Disulfidbrücken in grün dargestellt. Die lösungsmittelzugängliche Oberfläche ist in transparentem grau gezeigt.

Neben den Lassoptiden der Klassen I und II, deren Lassostrukturen durch NMR-spektroskopische Studien bewiesen wurden, sind in der Literatur drei verzweigt-zyklische Peptide beschrieben, die über einen N-terminalen Makrolaktamring aus acht oder neun Aminosäuren verfügen (Abbildung 1.15). Dabei handelt es sich um Anantin aus *Streptomyces coeruleus* [117,118], Propeptin aus *Microbispora* sp. SNA-115 [119,120] und BI-32169 aus *Streptomyces* sp. [121]. Alle drei Peptide sind ausschließlich aus proteinogenen Aminosäuren aufgebaut, was einen ribosomalen Ursprung nahelegt. Sie variieren in ihrer Länge zwischen 17 und 19 Aminosäuren und der Makrolaktamring resultiert aus einer Kondensationsreaktion von Gly1 mit Asp8 bzw. Asp9. Die

Ähnlichkeit ihrer Primärstruktur mit der bekannter Lasso peptide lässt ebenfalls eine Lassotopologie vermuten. Diese Hypothese muss jedoch durch eingehendere strukturelle Untersuchungen verifiziert oder widerlegt werden.

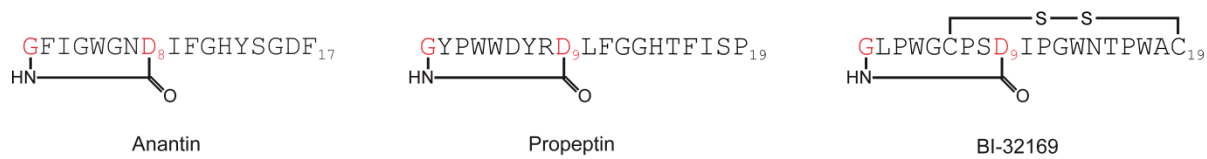


Abbildung 1.15: Verzweigt-zyklische Peptide aus proteinogenen Aminosäuren. Für die gezeigten Peptide liegen bisher keine strukturellen Untersuchungen vor. Aufgrund der Ähnlichkeit ihrer Primärstrukturen zu der bekannter Lasso peptide wird eine Lassostruktur vermutet.

1.7 Microcin J25

1.7.1 Struktur und Stabilität von MccJ25

Microcin J25 ist der am besten untersuchte Vertreter der Lasso peptide. MccJ25 wurde 1992 von Salomon *et al.* aus dem Kulturüberstand von *Escherichia coli* AY25 isoliert und als hydrophobes, antibakterielles Peptid mit einem Molekulargewicht von etwa 2 kDa beschrieben [111]. Dass es sich bei diesem antibakteriellen Peptid aus *E. coli* um ein Lasso peptide handelt, wurde erst im Jahr 2003 von drei unabhängigen Gruppen mittels NMR-spektroskopischen und massenspektrometrischen Studien eindeutig bewiesen [109,122,123]. Bis dahin wurde eine den zirkulären Bacteriocinen analoge makrozyklische Struktur angenommen [124,125]. MccJ25 setzt sich aus 21 proteinogenen Aminosäuren zusammen und ist durch einen 8-AS Makrolaktamring charakterisiert, der aus einer Kondensationsreaktion zwischen der α -NH₂-Gruppe des Gly1 und der γ -Carboxylgruppe des Glu8 hervorgeht (Abbildung 1.16). Der 13 Aminosäuren umfassende lineare C-Terminus ist durch den Ring hindurch gefädelt und durch Phe19 und Tyr20, die sich auf gegenüberliegenden Seiten der Ringebene befinden, sterisch fixiert. Durch die Positionierung zweier sterisch anspruchsvoller Reste ober- und unterhalb des Makrozyklus ist eine Bewegung des C-Terminus innerhalb des Rings nicht möglich. Die Lassostruktur von MccJ25 wird darüber hinaus durch zwei kurze antiparallele β -Faltblätter, einer Salzbrücke zwischen His5 und der α -Carboxylgruppe des terminalen Gly21, sowie durch van-der-Waals Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Seitenketten und dem Peptidrückgrat stabilisiert.

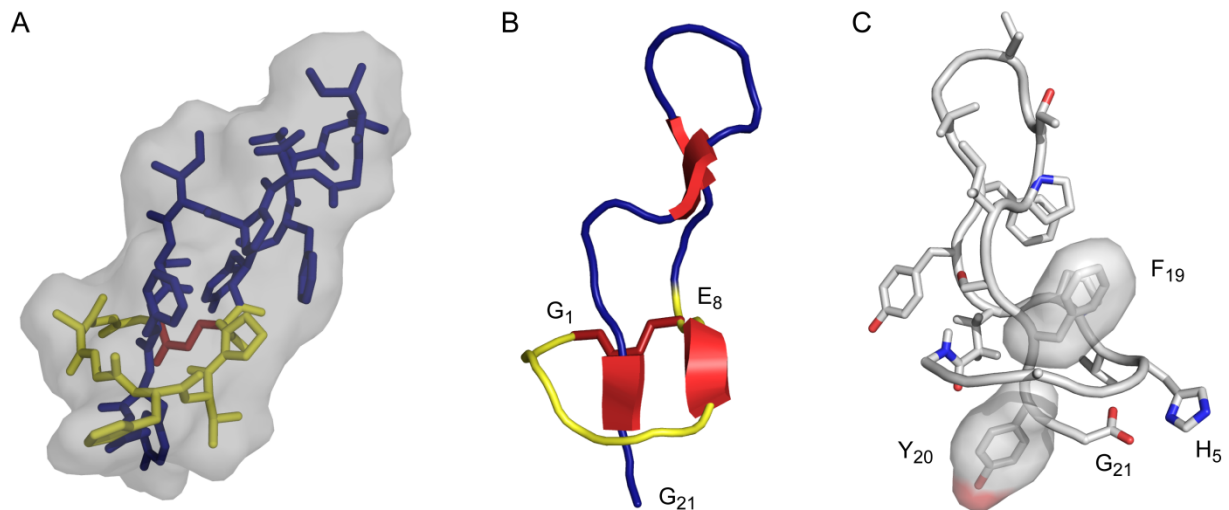


Abbildung 1.16: NMR-Struktur von Microcin J25. (A) Strukturüberblick (PDB 1Q71). Die Isopeptidbindung zwischen Gly1 und Glu8 ist rot, der daraus resultierende Makrolaktamring gelb und der durch den Ring hindurch gefädelt C-Terminus blau dargestellt. Die lösungsmittelzugängliche Oberfläche ist in transparentem grau gezeigt. (B) Sekundärstrukturelemente. Die zwei kurzen antiparallelen β -Faltblätter zwischen Val6-Pro7 und Ser18-Phe19 sowie Phe10-Val11 und Thr15-Pro16 sind in rot dargestellt. (C) Verankerung des hindurch gefädelten C-Terminus im Makrolaktamring. Phe19 und Tyr20 sind auf gegenüberliegenden Seiten der Ringebene des Makrozyklus positioniert und verhindern eine Entfaltung der Lassostruktur durch sterische Hinderung. Eine Salzbrücke zwischen der α -Carboxylgruppe von Gly21 und des Imidazolrings des His5 sorgen für eine weitere Stabilisierung.

Aus der ungewöhnlichen Lassostruktur resultiert eine außerordentliche Stabilität gegenüber extremen pH-Werten, hohen Temperaturen, chemischen Denaturierungsmitteln und Proteasen [36,124]. Lediglich intensiver Thermolysinverdau führt zu einer Spaltung der Peptidbindung zwischen Phe10 und Val11 [124]. Diese Proteolyse liefert jedoch nicht zwei isolierte Peptide, sondern einen binären Peptidkomplex (t-MccJ25) aus dem verzweigt-zyklischen Fragment Gly1-Phe10 und dem linearen Peptid Val11-Gly21, dessen Struktur so stabil ist, dass sie sogar NMR-spektroskopisch bestimmt werden konnte (Abbildung 1.17) [126]. Der binäre Peptidkomplex dissoziiert nicht in 8 M Harnstoff und zeigt eine im Vergleich zum intakten Peptid um den Faktor 100 geringere antibakterielle Aktivität [126,127]. Derartige binäre Peptidkomplexe wurden neben dem Thermolysinverdau auch bei der Fragmentierung von MccJ25 in der Gasphase beobachtet und gelten als massenspektrometrischer Beweis der Lassostruktur, da ihre Bildung nicht mit anderen Konformationen erklärt werden kann [109,122,128]. Darüber hinaus unterscheidet sich das Fragmentierungsverhalten in der Gasphase signifikant von dem eines verzweigt-zyklischen Peptids ohne Lassotopologie. Die Intensität der b- und y-Fragmentionen ist im Falle der Lassostruktur wesentlich geringer, was mit der rigideren Struktur erklärt werden kann [122]. Dies ist vermutlich auch die Ursache für den dominierenden Verlust von Neutalmolekülen, der bei nativem MccJ25 im Gegensatz zum synthetischen Laktam überwiegt.

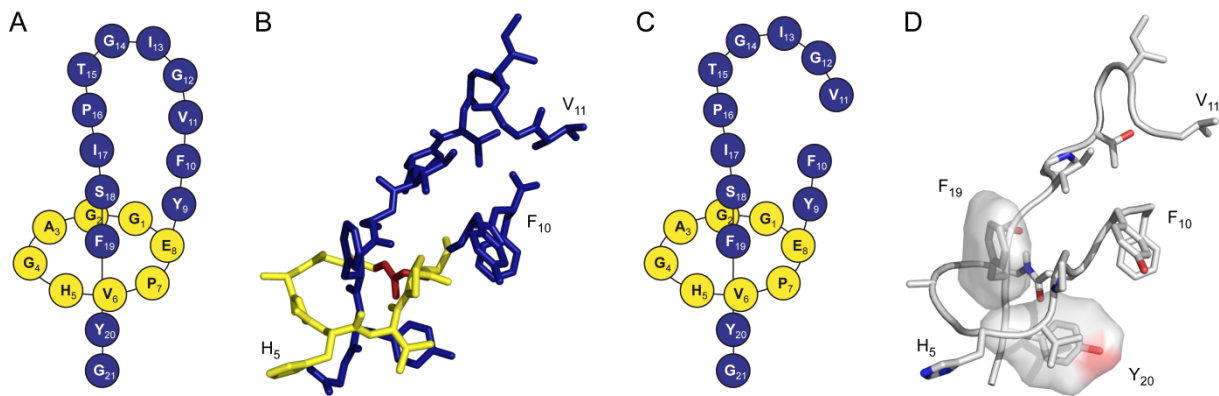


Abbildung 1.17: NMR-Struktur von MccJ25 nach Spaltung durch Thermolysin (t-MccJ25). (A) Schematische Darstellung von MccJ25. (B,D) NMR-Struktur von MccJ25 nach Thermolysinverdau (PDB 1S7P). Thermolysin spaltet die Peptidbindung zwischen Phe10 und Val11. Durch die sterische Fixierung des C-Terminus durch Phe19 und Tyr20 entstehen dabei nicht zwei Peptide, sondern ein binärer Peptidkomplex. (C) Schematische Darstellung von t-MccJ25.

1.7.2 Gencluster und Biosynthese von MccJ25

Nicht alle *Escherichia coli*-Stämme sind in der Lage, Microcin J25 zu produzieren. Die Biosynthese ist abhängig von der Präsenz des 50 kb Plasmids pTUC100, das das Biosynthesegencluster trägt [129]. Das MccJ25-Gencluster enthält vier Gene, die in zwei Operons organisiert sind, und stellt bisher das einzige bekannte Cluster für die Biosynthese von lassostrukturierten Peptiden dar (Abbildung 1.18). Das erste Operon enthält das Gen *mcjA*, das für den Lasso-peptidvorläufer kodiert. McjA besteht aus 58 Aminosäuren, von denen die N-terminalen 37 AS das Leaderpeptid und die C-terminalen 21 AS das Kernpeptid (Lassosequenz) darstellen. Das zweite Operon umfasst die Gene *mcjB* und *mcjC*, die für die Reifung des Peptids notwendig sind, sowie das Gen *mcjD*, dessen Genprodukt für den Export und die Immunität verantwortlich ist [130].

Die Reifung des Lasso-peptids aus dem Vorläuferprotein McjA bedarf (I) der proteolytischen Abspaltung des Leaderpeptids, wobei mit der α -NH₂-Gruppe das Nukleophil der Kondensationsreaktion generiert wird, (II) der Seitenkettenaktivierung der γ -Carboxylgruppe des Glu8, dem Elektrophil der Zyklisierungsreaktion, (III) der Vorfaltung des Kernpeptids in eine lassoartige Topologie sowie (IV) der Makrozyklisierung. Dabei ist entscheidend, dass die Vorfaltung der Makrozyklisierung voraus geht, da die sterisch anspruchsvollen Reste (Phe19, Tyr20) den geschlossenen Makrolaktamring nicht passieren können, also die Bildung der Lassostruktur aus der verzweigt-zyklischen Struktur und umgekehrt nicht erfolgen kann. Genetische Studien und *in vitro* Rekonstitutionen der Biosynthese von MccJ25 haben gezeigt, dass die beiden Reifungsenzyme McjB und McjC alleine in der Lage sind, diese notwendigen Einzelreaktionen auszuführen und damit das lineare McjA in das lassostrukturierte MccJ25 zu konvertieren [128,130,131]. Dabei war die Zugabe von ATP, Mg²⁺ und DTT essentiell für die Reifung des Lasso-peptids. Bisher ist es jedoch nicht gelungen, Intermediate (z.B. lineares MccJ25) der Biosynthese nachzuweisen, so dass den beiden Enzymen keine Einzelreaktionen zugeordnet werden können. Allerdings können auf der Basis von Homologievergleichen putative Funktionen für die prozessierenden Enzyme formuliert werden.

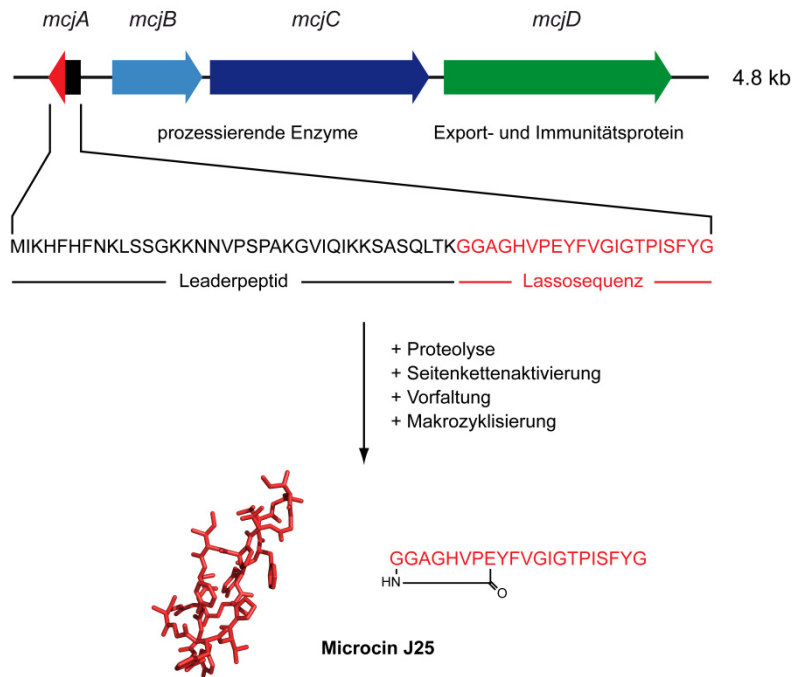


Abbildung 1.18: Biosynthesegencluster von Microcin J25. Die Lassosequenz wird durch die prozessierenden Enzyme McjB/McjC aus dem Vorläuferprotein McjA mittels Proteolyse freigesetzt und in das lassostrukturierte MccJ25 konvertiert.

McjB zeigt geringe Homologie zu Transglutaminasen (Tabelle 1.4). Diese Proteine katalysieren die kovalente Quervernetzung von Proteinen durch eine Acyltransferreaktion zwischen der γ -Carboxamidfunktion eines Glutamins des einen Proteins und der ε -Aminogruppe eines Lysins des anderen Proteins (Abbildung 1.19), wobei auch andere primäre Amine als Acylakzeptoren dienen können [132]. Enzyme dieser Superfamilie verfügen über jeweils einen konservierten Cystein-, Histidin- und Aspartatrest, die zusammen eine katalytische Triade bilden. Da viele bakterielle Transglutaminasen vermutlich Proteasen darstellen [133], also die Rückreaktion der eigentlichen Transferreaktion katalysieren, ist anzunehmen, dass die Proteolyse des Vorläuferproteins McjA unter Bildung des linearen MccJ25 von McjB katalysiert wird.

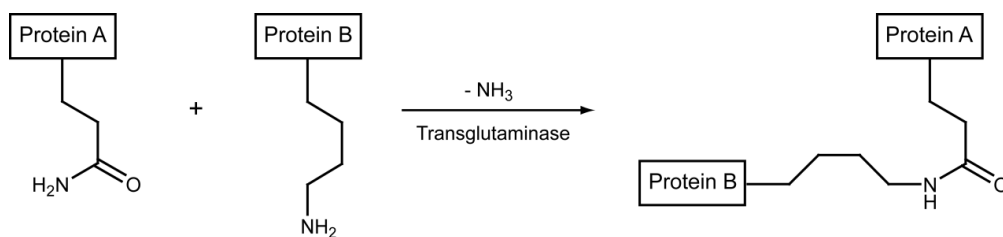


Abbildung 1.19: Proteinquervernetzung durch Transglutaminasen. Die Transglutaminase greift mit dem Cysteinrest der katalytischen Triade nukleophil die Säureamidfunktion eines Glutaminrests innerhalb des Proteins A unter der Bildung eines Acyl-Enzym-Intermediats an. Der kovalente Komplex wird durch den nukleophilen Angriff der ε -Aminogruppe eines Lysinrestes des Proteins B gespalten, wodurch die Transglutaminase regeneriert und Protein A und Protein B kovalent quervernetzt werden.

McjC zeigt Homologien zu Asparaginsynthetasen der Klasse B (AsnB) sowie zu β -Laktamsynthetasen (β -LS). β -Laktamsynthetasen katalysieren die Bildung des β -Laktamrings der Clavulansäure [134,135], während Asparaginsynthetasen die Bildung von Asparagin aus Aspartat unter Verwendung von Glutamin als Ammoniakquelle katalysieren (Abbildung 1.20) [136]. Beide Enzyme verwenden Mg^{2+} und ATP als Kofaktoren und katalysieren die Bildung einer Amidbindung im Anschluss an die Aktivierung einer Carboxylgruppe durch Adenylierung. Bei den AsnBs handelt es sich um Proteine aus zwei Domänen, bei denen die N-terminale Domäne eine Glutaminbindungsstelle besitzt und die Hydrolyse von Glutamin zu Glutamat und Ammoniak katalysiert. Die C-terminale Domäne katalysiert die ATP-abhängige Adenylierung der β -Carboxylgruppe des Aspartats und die anschließende Reaktion der aktivierten Carboxylfunktion mit NH_3 unter der Bildung von Asparagin. Ein Tunnel verbindet die N- und C-terminale Domäne und ermöglicht den Transport des generierten NH_3 zur C-terminalen Domäne [136]. Die Funktionen der homologen Proteine legen daher eine Rolle bei der Seitenkettenaktivierung des Glutamats für McjC nahe. Interessanterweise ist ein für die Hydrolyse des Glutamins essentieller Cysteinrest in der N-terminalen Domäne der AsnB in McjC nicht vorhanden. Diese katalytische Aktivität ist für die Makrolaktambildung in MccJ25 auch nicht notwendig, da in Analogie zur Clavulansäuresynthese eine intramolekulare Aminogruppe als Nukleophil Verwendung findet.

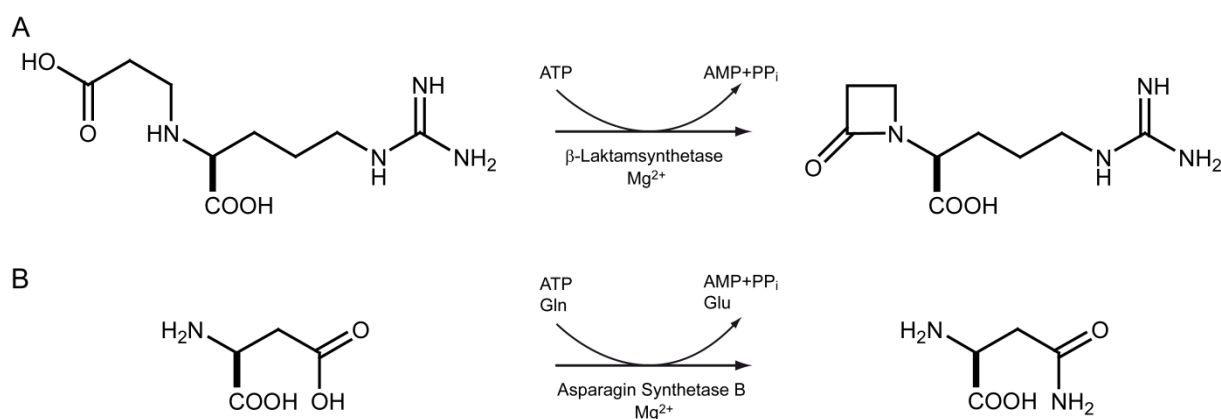


Abbildung 1.20: Katalysierte Reaktionen der McjC-homologen Enzyme. (A) β -Laktamringbildung durch die β -Laktamsynthetase bei der Konversion von N-Carboxyethyl-L-Arginin (CEA) zu Desoxyguanidinoproclavaminsäure (DPGC) im Rahmen der Clavulansäuresynthese. (B) Asparaginsynthese aus Aspartat unter Verwendung von Glutamin als Ammoniakquelle durch die Asparagin Synthetase B. Bei beiden Reaktionen wird die Carboxylgruppe, die jeweils das Elektrophil der Amidbildungsreaktion darstellt, unter ATP-Verbrauch als Adenylat aktiviert.

McjD ist homolog zu ABC-Transportern und verantwortlich für die Sekretion des intrazellulär gebildeten MccJ25. Darüber hinaus verleiht es dem Produzentenstamm Resistenz gegenüber dem Peptidantibiotikum, indem sowohl endogenes als auch exogenes MccJ25 exportiert und somit die Konzentration innerhalb der Zelle gering gehalten wird [129].

Tabelle 1.4: Eigenschaften der Genprodukte des MccJ25-Genclusters.

Protein	N _{AS}	Homologie	Postulierte Funktion	GenBank Zugangsnummer
McjA	58	-	MccJ25 Vorläuferprotein	AAD28494.1
McjB	208	Transglutaminase	Protease	AAD28495.1
McjC	513	Asparagin Synthetase B β-Laktamsynthetase	Adenylierung; Zyklisierung	Q9X2V9.2 ¹
McjD	580	ABC-Transporter	Exporter; Immunitätsprotein	AAD28497.1

¹Swiss-Prot Zugangsnummer

Demzufolge kann folgendes Biosyntheschema für die Bildung von MccJ25 postuliert werden (Abbildung 1.21): Der 58-AS Vorläufer McjA wird durch McjB proteolytisch in das Leaderpeptid und das Kernpeptid (Lassosequenz) gespalten, wobei mit der α-Aminogruppe des Gly1 das Nukleophil der Zyklisierungsreaktion freigesetzt wird. McjC katalysiert in einer ATP- und Mg²⁺-abhängigen Reaktion die Adenylierung der Seitenkettencarboxylgruppe von Glu8, also die Aktivierung des Elektrophils. Nach einer Vorfaltung des 21-AS Peptids in eine lassoartige Topologie wird der Makrolaktamring in einer Kondensationsreaktion gebildet und damit die finale Lassostruktur generiert. Das gereifte Peptid wird im Anschluss durch den Exporter McjD sekretiert.

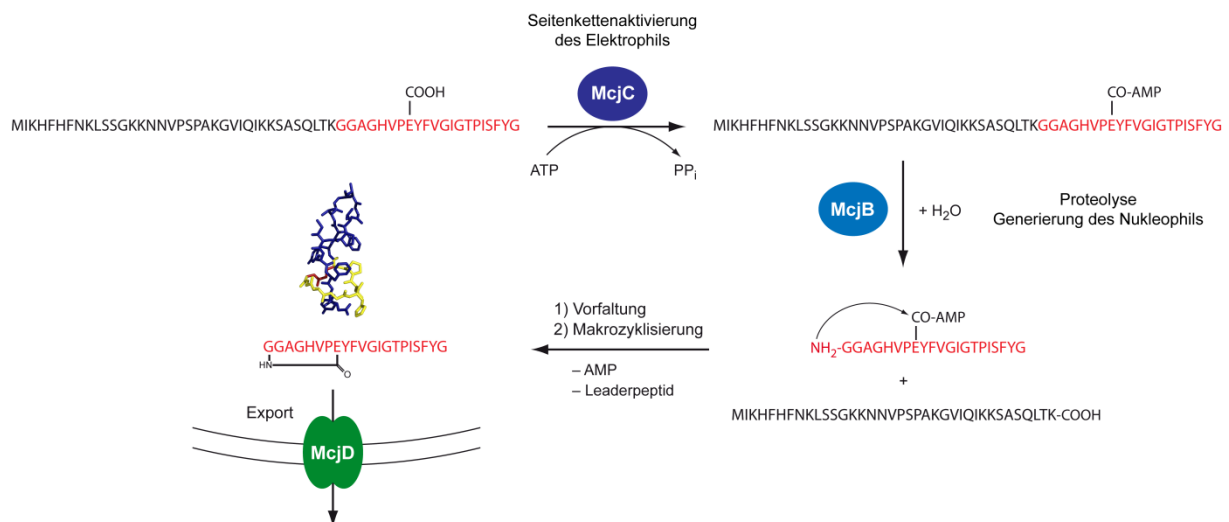


Abbildung 1.21: Postulierte Biosynthese von MccJ25. Das zur Asparagin Synthetase B homologe McjC katalysiert wahrscheinlich in einer ATP- und Mg²⁺-abhängigen Reaktion die Adenylierung der γ-Carboxylgruppe des Glu8 innerhalb der Lassosequenz von McjA (rot). McjB zeigt geringe Homologien zu Transglutaminasen und hydrolysiert vermutlich die Peptidbindung zwischen Leaderpeptid (schwarz) und Lassosequenz. Die freigesetzte α-Aminogruppe des Gly1 repräsentiert das Nukleophil in der nachfolgenden Makrozyklisierungsreaktion, bei der Gly1 und Glu8 durch eine Isopeptidbindung verknüpft werden. Der Ausbildung des Makrolaktamrings geht eine Vorfaltung der Lassosequenz in eine lassoartige Topologie voraus. Das gereifte Peptid wird durch den ABC-Transporter McjD aus der Produzentenzelle exportiert. Die Abfolge der Reifungsreaktionen ist auch in umgekehrter Reihenfolge denkbar.

1.7.3 Selbstimmunität und biologische Aktivität von MccJ25

Für den Produzenten einer bioaktiven Verbindung ist die Gewährleistung der eigenen Immunität gegenüber dem Naturstoff entscheidend. Im Falle des MccJ25 ist neben McjD das äußere Membranprotein TolC für die Selbstimmunität essentiell [137]. TolC ist ein trimeres α -Fass Protein, das in der äußeren Membran integriert ist und den periplasmatischen Raum bis in die Nähe der inneren Zellmembran durchspannt [138]. TolC-abhängige Transportmaschinerien spielen beim Export von Virulenzfaktoren und antibakteriellen Verbindungen eine Rolle. Interessanterweise wurde neben dem im Gencluster kodierten Exporter McjD mit dem ABC-Transporter YojI ein alternatives Exportprotein identifiziert, das die Funktion von McjD übernehmen kann [139].

MccJ25 zeigt eine antibakterielle Aktivität gegenüber einer Vielzahl an Enterobacteriaceae, unter anderem gegen pathogene *Salmonella*-, *Shigella*- und *Escherichia*-Stämme mit MIC-Werten im nanomolaren Bereich [124,140]. Dabei ist die Aktivität abhängig von der Lassofaltung des Peptids und kann aufgrund der hohen Stabilität dieser Struktur nicht durch Inkubation bei 165 °C oder durch starke Denaturierungsmittel beeinflusst werden [127]. Lineares MccJ25 und das synthetische Laktam (verzweigt-zyklisches Peptid ohne Lassotopologie) besitzen keine biologische Aktivität [122]. MccJ25 nutzt den Komplex aus FhuA und TonB/ExbB/ExbD aus, um in die Zielzellen einzudringen [140-142]. Die eigentliche physiologische Funktion dieses Komplexes liegt in der Aufnahme von Hydroxamatsiderophoren, allerdings dient er daneben auch als Rezeptor für Colicine und Bakteriophagen sowie als Transporter für verschiedene Antibiotika [143]. Der Komplex vermittelt den Transport durch die äußere Zellmembran. Darüber hinaus ist SbmA für die Sensitivität gegenüber MccJ25 notwendig und für den Transport über die innere Membran verantwortlich [142]. Das intrazelluläre Zielmolekül von Microcin J25 ist die RNA-Polymerase [144]. *In vitro* Transkriptionsstudien haben gezeigt, dass MccJ25 in der Lage ist, die RNA-Polymerase gramnegativer Bakterien zu inhibieren. Quervernetzungs- und Fluoreszenz Resonanz Energietransfer (FRET)-Experimente identifizierten den sekundären Kanal der RNA-Polymerase als Bindungsstelle des Peptids mit einer K_D von 0.6 μ M [115,116]. Da der sekundäre Kanal zur NTP-Aufnahme dient, ist anzunehmen, dass MccJ25 durch Bindung innerhalb des Kanals den Eintritt der NTPs und damit der Substrate der RNA-Synthese verhindert. Gestützt wird dieser Befund durch resistenzvermittelnde Mutationen innerhalb des sekundären Kanals der RNA-Polymerase gramnegativer Bakterien [116,145].

1.7.4 Spezifität der MccJ25-Biosynthesemaschinerie

Ribosomale Peptide erlauben aufgrund ihrer genetischen Kodierung der Vorläuferproteine die Herstellung von Mutantenbibliotheken durch genetisches Engineering. Diese Mutanten der Vorläuferproteine können anschließend hinsichtlich ihrer Prozessierung in die gereiften Peptide untersucht und Derivate der Naturstoffe bezüglich ihrer biologischen Aktivität analysiert werden. Die Möglichkeit durch etablierte molekularbiologische Techniken eine Vielzahl von Peptidvarianten zu generieren, ist ein entscheidender Vorteil ribosomaler Peptide gegenüber den nichtribosomalen Vertretern, bei denen die Herstellung von Derivaten *in vivo* einer sehr anspruchsvollen

Reprogrammierung der multimodularen Enzymkomplexe bedarf. Entscheidende Voraussetzung für diesen Mutageneseansatz ist die Kenntnis des genetischen Systems, das für die Produktion des ribosomalen Peptids verantwortlich ist. Daher ist von den bekannten Lassozeptiden lediglich MccJ25 für eine derartige Untersuchung geeignet, da die Biosynthesecuster der übrigen Vertreter unbekannt sind.

Severinov *et al.* haben als erste diesen Ansatz für MccJ25 durchgeführt und eine vollständige Bibliothek von Punktmutanten generiert, bei denen jede Aminosäure mit Ausnahme von Glu8 durch die übrigen 19 proteinogenen Aminosäuren substituiert wurde [146]. Für Glu8 wurde lediglich die chemisch sinnvolle Mutation zu Aspartat untersucht. Insgesamt wurden 381 Einzelmutanten von MccJ25, die alle in der Lassosequenz lokalisiert waren, bezüglich ihrer Konversion in Microcin J25-Derivate evaluiert. Dabei zeigte sich, dass 242 der 381 Mutanten (64%) in die Lassostruktur konvertiert wurden, also 242 neue MccJ25-Varianten mittels dieses Ansatzes produziert werden konnten. Als kritische Positionen wurden Gly1, Gly2 und Tyr20 identifiziert (Abbildung 1.22A und B). Gly1 und Gly2 konnten durch keine andere der 19 proteinogenen Aminosäuren ersetzt werden. Für Tyr20, das der sterischen Verankerung des C-Terminus dient, wurde lediglich eine Substitution durch Phenylalanin oder Isoleucin, beides C β -verzweigte und damit ebenfalls sterisch anspruchsvolle Aminosäuren, toleriert. Darüber hinaus wurde die E8D-Mutante von MccJ25 nicht produziert, so dass Glu8 ebenfalls als essentielle Aminosäure eingestuft werden kann. Diese vier kritischen Positionen bilden eine diskrete, kontinuierliche Fläche auf der Oberfläche von MccJ25 (Abbildung 1.22C). Vermutlich ist die Wechselwirkung der Biosynthesemaschinerie mit dieser Fläche entscheidend bei der Konversion des Vorläuferproteins in das lassostrukturierte Peptid.

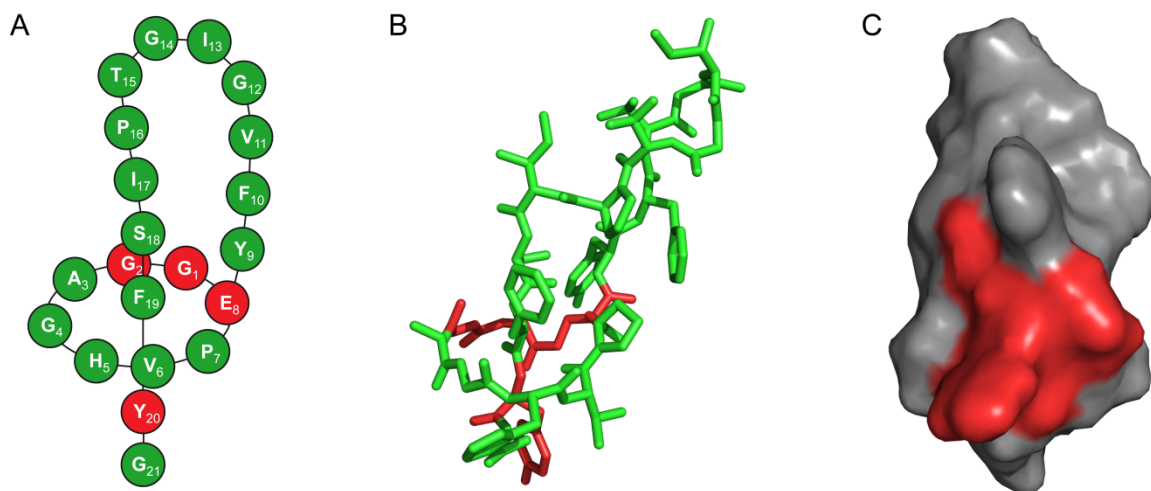


Abbildung 1.22: Mutagenesestudien zur Reifung von MccJ25. Schematische Darstellung (A) und NMR Struktur (B) von MccJ25. Die Farbgebung entspricht einem Ampelschema (grün: Substitutionen werden toleriert; rot: Substitutionen werden nicht toleriert). (C) Lösungsmittelzugängliche Oberfläche von MccJ25. Die kritischen Positionen bilden auf der Moleküloberfläche eine kontinuierliche Fläche (rot).

Die 242 neuen Varianten wurden auch hinsichtlich ihres Potentials zur Inhibition der RNA-Polymerase sowie ihrer Fähigkeit, das Wachstum von gramnegativen Bakterien zu inhibieren, analysiert. Dabei zeigten 155 der 242 produzierten Derivate weiterhin inhibitorische Aktivität gegenüber der RNA-

Polymerase. Die Positionen Gly4, Pro7, Tyr9, Phe10 und Phe19 erwiesen sich als kritisch für die Wechselwirkung mit der RNA-Polymerase, da dort lokalisierte Substitutionen in einem Verlust der inhibierenden Wirkung resultierten (Abbildung 1.23A). Interessanterweise bilden diese fünf Reste eine kontinuierliche Fläche auf der Oberfläche von MccJ25 (Abbildung 1.23B und C). Vermutlich ist dieses Motiv für eine produktive Interaktion mit dem sekundären Kanal der RNA-Polymerase entscheidend.

Bei Wachstumsstudien mit *E. coli* DH5 α und *S. flexnerie* zeigten 70 der 155 MccJ25-Varianten, die die RNA-Polymerase inhibierten, einen antibakteriellen Effekt. Dabei wurden für die Positionen Gly4, Pro7, Phe10, Phe19 und Tyr20 keine Substitutionen toleriert. Es ist anzunehmen, dass diese Reste eine entscheidende Rolle beim Import in die Zielzelle spielen. Sie bilden jedoch keine zusammenhängende Fläche auf der Moleküloberfläche des Lassopeptids aus. Dies liegt vermutlich darin begründet, dass der Import in die Zielzelle einer Wechselwirkung mit unterschiedlichen Proteinen bedarf, da sowohl Interaktionen mit Transportproteinen der äußeren als auch der inneren Membran für ein Eindringen notwendig sind.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die unerwartet hohe Toleranz der Biosynthesemaschinerie gegenüber den Einzelsubstitutionen für eine breite Promiskuität der Reifungsenzyme spricht und damit in Kombination mit den hervorragenden Stabilitätseigenschaften die Attraktivität von MccJ25 für Protein Engineering Strategien weiter erhöht.

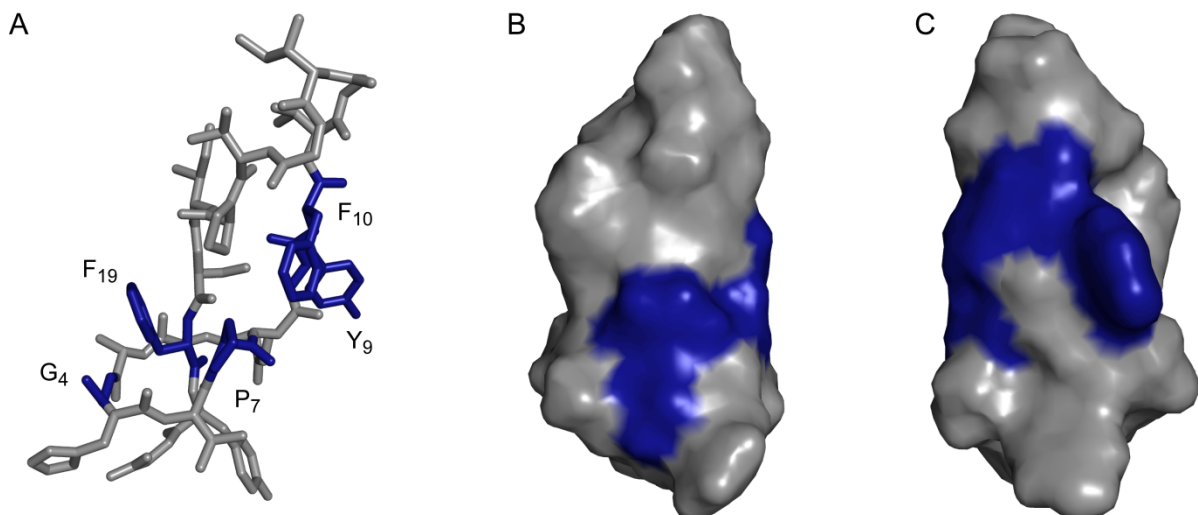


Abbildung 1.23: Einfluss der Einzelsubstitutionen auf die Inhibition der RNA-Polymerase. (A) NMR-Struktur von MccJ25 (PDB 1Q71). Kritische Positionen für die Inhibition der RNA-Polymerase sind in blau markiert. (B) Die für die Inhibition als essentiell identifizierten Aminosäuren bilden ein kontinuierliches Motiv (blau) auf der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche von MccJ25. (C) Entspricht (B) nach einer 180 °-Drehung um die y-Achse.

Neben der Lassosequenz wurde kürzlich auch eine Mutagenesestudie zur Untersuchung des Einflusses des Leaderpeptids durchgeführt [147]. Dabei wurden N-terminal verkürzte McjA-Varianten in einem genetisch modifizierten MccJ25-Gencluster [148] auf ihre Prozessierbarkeit durch die Reifungsenzyme hin untersucht. Es zeigte sich, dass der Großteil des Leaderpeptids nicht essentiell

für die Konversion des Kernpeptids in die Lassostruktur ist. Die N-terminalen 28 Aminosäuren konnten entfernt werden, ohne die MccJ25-Biosynthese vollständig zu unterdrücken. Die Verkürzung resultierte zwar in einer 250-fachen Reduzierung der Lassozeptidproduktion, aber dennoch waren die Reifungsenzyme in der Lage, den N-terminal verkürzten ribosomalen Vorläufer zu prozessieren. Demzufolge besteht das Minimalsystem der MccJ25-Biosynthese bezogen auf das Vorläuferprotein aus McjA₃₀₋₅₈, einem Protein/Peptid von lediglich 30 Aminosäuren Länge (Abbildung 1.24). Das minimale Leaderpeptid (Lys30 – Lys37) wurde daraufhin einem Alaninscan unterzogen, um die für die Konversion kritischen Positionen zu identifizieren. Dabei wurde eine entscheidende Rolle von Thr36 beobachtet, das der P2-Position der Proteaseschnittstelle zwischen Leaderpeptid und Lassosequenz entspricht, da eine Substitution durch Alanin die Lassozeptidbiosynthese inhibierte.

Die Ergebnisse der Leaderpeptidverkürzungen zeigen, dass das Leaderpeptid sehr wahrscheinlich keine Chaperonfunktion ausübt, sondern eher eine Rolle bei der Erkennung des Vorläuferproteins durch die Biosynthesemaschinerie spielt. Allerdings ist mit nur acht essentiellen Resten ein Großteil des McjA-Leaderpeptids für diese Wechselwirkung nicht entscheidend.



Abbildung 1.24: Minimales Vorläuferprotein zur Biosynthese von MccJ25. Studien zur Reifung von N-terminal verkürzten McjA-Varianten definierten das minimale Vorläuferprotein McjA₃₀₋₅₈, das durch die prozessierenden Enzyme McjB/McjC in das lassostrukturierte Peptid konvertiert werden kann. Thr36 in der P2-Position der Proteaseschnittstelle wurde anhand eines Alaninscans des minimalen Leaderpeptids als kritisch für die Prozessierung identifiziert und ist unterstrichen hervorgehoben.

1.8 Aufgabenstellung

Das primäre Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer rationalen Strategie zur Identifizierung kryptischer Lassopeptidbiosynthesecuster in bakteriellen Genomen. Das Potential dieses Genomischen Minings sollte anhand der Isolierung eines neuen, bisher unbekannten Lassopeptids verdeutlicht werden. Der Naturstoff sollte anschließend in Bezug auf seine Struktur und Stabilität näher untersucht werden, um die Ursachen der stabilen Lassoform auf molekularer Ebene zu verstehen. Darüber hinaus stand die biologische Aktivität und Biosynthese des Peptids im Mittelpunkt des Interesses, wobei insbesondere die Spezifität der Reifungsenzyme untersucht werden sollte. Für die Aufklärung der Biosynthese waren sowohl Mutagenesestudien in einem zu entwickelnden heterologen Produktionssystem als auch *in vitro* Studien unter Verwendung der gereinigten prozessierenden Enzyme vorgesehen.

Neben dem Ziel einen neuen Vertreter lassostrukturierter Peptide mittels Genomischen Minings zu isolieren, war die Strukturanalyse der Peptide BI-32169 und Anantin, die beide über eine verzweigt-zyklische Primärstruktur verfügen, Gegenstand dieser Arbeit. Dabei sollte die bisher postulierte Lassostruktur durch massenspektrometrische und NMR-spektroskopische Studien verifiziert oder widerlegt werden.

Darüber hinaus sollte im Rahmen dieser Arbeit das Anwendungspotential von Lassopeptiden für Protein Engineering Ansätze zur Generierung stabiler Peptid-basierter Wirkstoffe analysiert werden. Dabei war die zentrale Fragestellung, ob durch die Insertion von bioaktiven Epitopen neue biologische Funktionen in das Lassopeptidgerüst eingeführt und damit die funktionalen Eigenschaften der Epitope mit den hervorragenden Stabilitätseigenschaften lassostrukturierter Peptide kombiniert werden können. Als bioaktives Epitop wurde das Integrinbindungsmotiv RGD ausgewählt und sollte in das Lassopeptidrückgrat von MccJ25 insertiert werden, um mit dem modifizierten Peptid den ersten Integrininhibitor auf Lassopeptidbasis präsentieren zu können.

2. Material

2.1 Geräte

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte mit Angabe des Herstellers und der Typenbezeichnung.

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
Autoklav	Tuttnauer 5075 ELV Fedegari Autoclavi SPA FVA3/A1
Analysewaage	Sartorius
Bidestillationsanlage für Wasser	Seral Seralpur Pro90CN
Brutschrank	Köttermann 2736
CD-Spektrometer	Jasco J-810
Clean-Bench	Antair BSK
Dokumentationseinheit für DNA-Agarosegele und SDS-Polyacrylamidgele	Cybertech CS1 Videokamera Mitsubishi Video Copy Processor Thermodrucker
Elektrophoreseeinheit	Agarosegelkammer (hergestellt von Philipps-Universität Marburg) BioRad MiniProtean 3 Gelkammer
Elektroporationspulsler	BioRad Gene Pulser II Electroporator
Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) System	Amersham Pharmacia FPLC-System 250: Gradienten-Programmer GP-250, Pumpen P-500, Uvicord Optische Einheit UV-1 ($\lambda = 280 \text{ nm}$), Uvicord Kontrolleinheit UV-1, Injektionsventil V-7, 2-Kanal Flachbrettschreiber REC-102, 3-Wege-Magnetventil PSV-100, Fraktionskollektor FRAC-100; Amersham Pharmacia Äkta™ Prime
French-Press	SLM Aminco French Pressure Cell Press 5.1 Thermo Spectronic Standard Cell 40 KP
LTQ-FT-ICR-Massenspektrometer	Thermo Fischer Scientific
Gefriertrocknungsanlage	Christ Alpha 2-4 LSC
Heizschüttler	Eppendorf Thermomixer Comfort
HPLC-System	Agilent series 1100 HPLC-System: Vakuumentgaser, DAD-Detektor, Quaternäre Pumpe, Autosampler, Fraktionskollektor, HP-Chemstation Software
Luftschüttler	New Brunswick Scientific Series 25 Incubator Shaker New Brunswick Scientific Innova 4300 Incubator Shaker
MALDI-TOF	Bruker Biflex III
NMR-Spektrometer	Bruker Avance 600

Material	
pH-Meter	Schott CG 840
Photometer	Pharmacia Biotech Ultrospec 3100 pro Thermo Scientific Nanodrop 1000
Pipetten	Eppendorf Research Serie
Q-TOF-Massenspektrometer	Applied Biosystems API QStar Pulsar i
Speed-Vac	Uniequib Univapo 150H
Thermocycler	Eppendorf Mastercycler Personal
Vortexer	Scientific Industries Vortex Genie 2
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5415D Heraeus Biofuge Pico Sorvall RC-5B Plus (SLA-3000, SLC-4000) Sorvall RC-26 Plus (SS-34)

2.2 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien, die nicht in Tabelle 2.2 aufgeführt sind, wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) in p.a. Qualität bezogen.

Tabelle 2.2: Übersicht der verwendeten Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien.

Hersteller (Vertriebsort)	Produkt
Agilent Technologies (Böblingen, Deutschland)	2,5-Dihydroxybenzoesäure
AppliChem (Darmstadt, Deutschland)	Ampicillin, Gentamycin, Kanamycin, Trimethoprim
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland)	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264 <i>Streptomyces</i> sp. (DSM 14996) <i>Streptomyces coeruleus</i> (DSM 4778)
Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	1.5 mL und 2.0 mL Reaktionsgefäße
Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)	Oligonukleotide
Eurogentech (Seraing, Belgien)	Agarose, Elektroporationsküvetten
European Molecular Biology Laboratory (Heidelberg, Deutschland)	pETMBP_1a, pETNus_1a, pETM10
Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)	PageRuler Unstained Protein Ladder
GATC (Konstanz, Deutschland)	DNA-Sequenzierung
GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)	HiTrap Desalting (5 mL), HisTrap HP (1 mL), GSTrap HP (1 mL)
Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)	<i>E. coli</i> BL21(DE3), <i>E. coli</i> TOP10, pBAD102/D-TOPO Expression Kit, Champion pET SUMO Expression System

Material

Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)	Nucleodur 125/2 C18ec, Nucleodur 250/12 C18ec
Millipore (Billerica, MA, USA)	Dialysemembran (0.025 µm Porengröße), Amicon Ultra-15 Konzentratoren
New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)	Phusion DNA-Polymerase, Desoxyribonukleotide (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 1 kb-DNA-Ladder, Proteinmarker, Restriktionsendonukleasen, <i>Escherichia coli</i> NEB 10-beta
Novagen	pET28a(+), pET31b(+), pET41a(+), pCDFDuet, pETDuet
Oxoid (Cambridge, Großbritannien)	Agar Nr. 1, Trypton
Qiagen (Hilden, Deutschland)	Ni ²⁺ -NTA-Agarose, QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick PCR Purification Kit
Roth (Karlsruhe, Deutschland)	Acrylamid, β-Mercaptoethanol, Ethidiumbromid
Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)	Pipettenspitzen, Falcon Tubes (15 und 50 mL)
Serva (Heidelberg, Deutschland)	Bromphenolblau, Triton X-100
Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)	Amberlite XAD16, Oligonukleotide, Carboxypeptidase Y, Elastase
VWR (Darmstadt, Deutschland)	Sterilfilter (0.20 µm und 0.45 µm)

2.3 Vektoren

Im Folgenden sind exemplarisch einige der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren beschrieben.

2.3.1 pET41a(+)

Der pET41a(+)-Vektor (Novagen) ermöglicht die Expression von rekombinanten Proteinen als Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine. Die N-terminale GST-Fusion kann zur Erhöhung der Löslichkeit heterolog exprimierter Proteine beitragen [149] und erlaubt gleichzeitig eine affinitätschromatographische Reinigung durch die Bindung an Glutathion-Sepharose. Desweiteren kann ein C-terminaler His(6)-Tag eingeführt werden. Die klonierten Gene stehen unter Kontrolle eines T7-Promotors und lac-Operators. Demzufolge ist die Transkription der klonierten Gene abhängig von der T7-Polymerase und durch IPTG induzierbar. Alternativ zum pET41a(+)-Vektor wurde der pET28a(+)-Vektor (Novagen) oder der pETM10-Vektor (EMBL) verwendet, die anstelle der N-terminalen GST-Fusion das Anfügen eines N-terminalen His(6)-Tags erlauben. Als Expressionsstamm wurde stets *E. coli* BL21(DE3) verwendet.

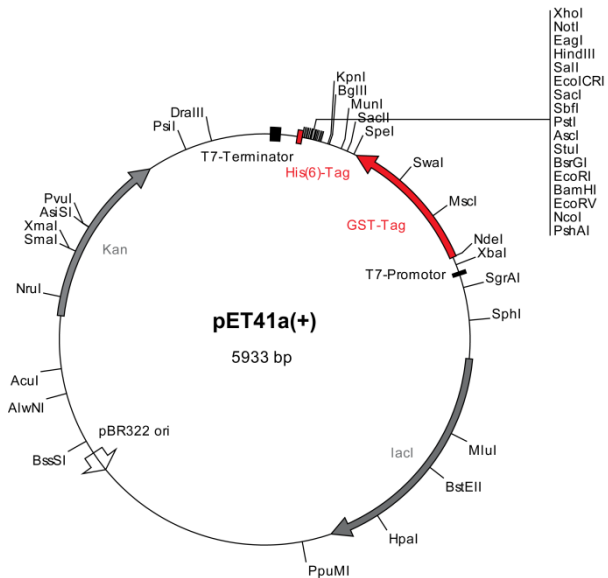


Abbildung 2.1: Physikalische Karte des pET41a(+)-Vektors.

2.3.2 pSCrhaB2

Der Expressionsvektor pSCrhaB2 wurde für genetische Untersuchungen des *Burkholderia cepacia*-Komplexes entwickelt [150]. Im pSCrhaB2-Vektor befindet sich das klonierte Gen unter der Kontrolle des Rhamnose-induzierbaren Promotors P_{rhaB} aus *E. coli* und wird nach Rhamnosezugabe von der endogenen RNA-Polymerase abgelesen. Der Trimethoprim-Resistenz verleihende Vektor wurde zur homologen Expression von CapA-Varianten in *Burkholderia thailandensis* E264 verwendet. Die Plasmidkonstrukte wurden in *E. coli* TOP10 kloniert.

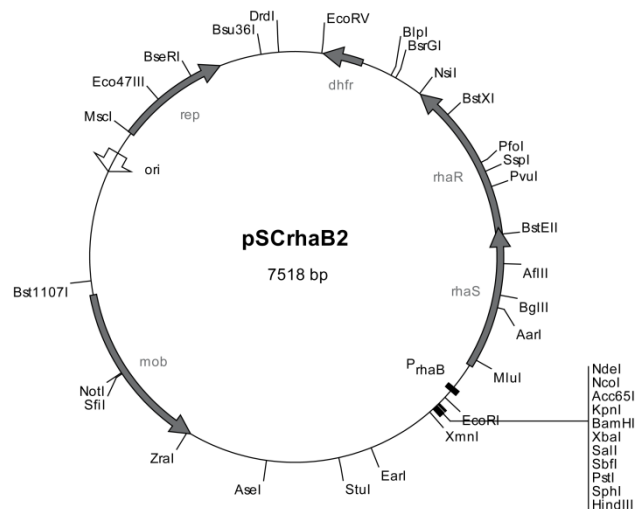


Abbildung 2.2: Physikalische Karte des pSCrhaB2-Vektors.

2.3.3 pCDFDuet

Der pCDFDuet-Vektor (Novagen) besitzt zwei multiple Klonierungsstellen (engl. multiple cloning site, MCS), die beide unter T7-Promotor- und lac-Operator-Kontrolle stehen. Die Transkription ist somit abhängig von der T7-Polymerase und induzierbar durch IPTG. In der MCS1 kann eine N-terminale His(6)-Tag- und in der MCS2 eine C-terminale S-Tag-Translationsfusion angefügt werden. Neben dem pCDFDuet-Vektor bietet Novagen noch drei weitere Duet-Vektoren an (pETDuet, pACYCDuet, pRSFDuet), die aufgrund unterschiedlicher Replikationsursprünge (engl. origin of replication, ori) und Resistenzmarker kombinierbar sind. Dadurch können bis zu acht Transkripte gleichzeitig synthetisiert werden. Als Expressionsstamm wurde stets *E. coli* BL21(DE3) verwendet.

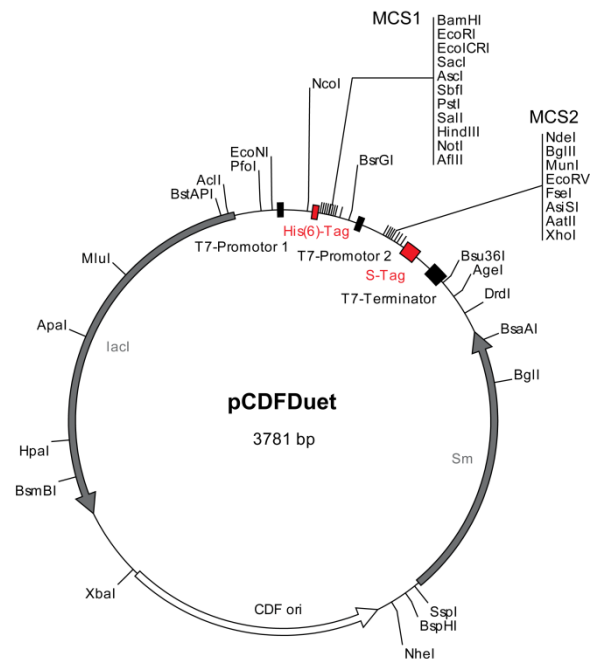


Abbildung 2.3: Physikalische Karte des pCDFDuet-Vektors.

2.3.4 pET31b(+)

Der pET31b(+)-Vektor (Novagen) ist ein Expressionsvektor, der die Expression des klonierten Gens als Ketosteroidisomerase (KSI)-Fusionsprotein ermöglicht. Das resultierende KSI-Fusionsprotein wird aufgrund der geringen Löslichkeit der KSI als *inclusion bodies* exprimiert. Dadurch können unstrukturierte Peptide oder Proteine, die aufgrund fehlender Sekundär- und Tertiärstrukturen proteaselabil sind, vor Proteolyse geschützt werden [151]. Das klonierte Gen steht unter der Kontrolle eines T7-Promotors und lac-Operators und kann durch die IPTG-induzierbare T7-Polymerase in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen transkribiert werden. Der pET31b(+)-Vektor wurde zur Expression des proteaselabilen Capstruinvorläufers CapA eingesetzt.

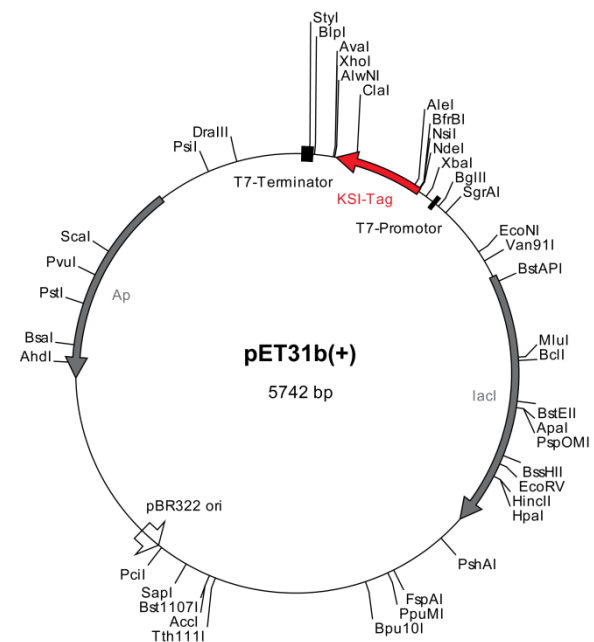


Abbildung 2.4: Physikalische Karte des pET31b(+)-Vektors.

2.3.5 pETMBP_1a

Der pETMBP_1a-Vektor (EMBL) ist ein Expressionsvektor, der eine Translationsfusion des klonierten Gens mit dem Maltosebindungsprotein (MBP) erlaubt. MBP ist aufgrund seiner sehr guten Löslichkeit in der Lage, die Löslichkeit der fusionierten Proteine zu erhöhen [152,153]. Durch die hochaffine Bindung des MBP an Maltose dient es zusätzlich als Affinitätstag zur Reinigung mittels einer Maltose-Matrix. Zusätzlich besitzt das MBP einen N-terminalen His(6)-Tag, der eine Reinigung mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie ermöglicht. Zur Abspaltung der MBP-Fusion befindet sich zwischen dem MBP und dem Zielprotein eine Schnittstelle für die TEV-Protease. Wie bei allen pET-Vektoren ist die Expression abhängig von der T7-Polymerase und IPTG-induzierbar. Der pETNusA_1a-Vektor unterscheidet sich vom pETMBP_1a-Vektor durch den Austausch des MBP durch das NusA (N utilization substance A)-Protein, das ebenfalls zur Erhöhung der Löslichkeit des Zielproteins beitragen kann [154]. Als Expressionsstamm wurde für beide Vektoren *E. coli* BL21(DE3) verwendet.

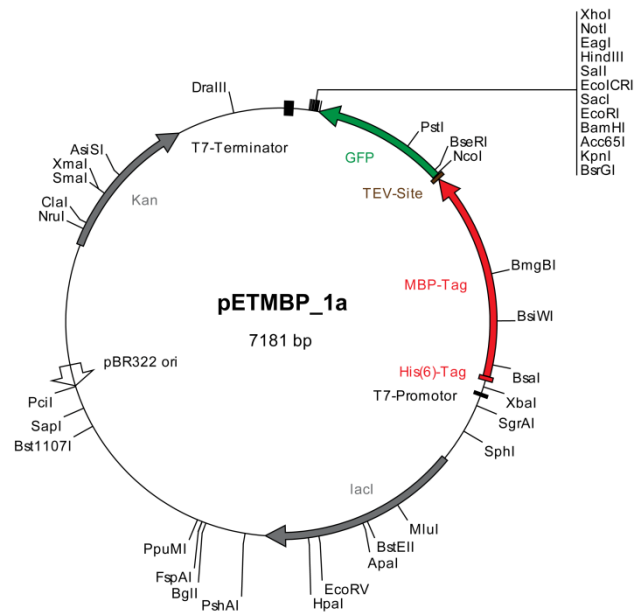


Abbildung 2.5: Physikalische Karte des pETMBP_1a-Vektors.

2.4 Oligonukleotide

Eine Auswahl der Oligonukleotide, die zur Amplifikation der Zielgene und zur Einführung von Mutationen verwendet wurden, ist in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tabelle 2.3: Auswahl der in dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer. Die jeweilige Restriktions- bzw. Mutationsstelle ist unterstrichen.

Primernamen	Sequenz (5' - 3')	Restriktionsenzym	Vektor	Zielgen
5'-capA_1	ATATCATATGGTTCGACTTTTGGCGAAGCTGC	<i>NdeI</i>	pET28a(+)	<i>capA</i>
3'-capA_1	ATATCTCGAGTTAATTGAACCCGAAGCGCGAAATGACG	<i>XhoI</i>	pCDFDuet	
5'-capA_2	ATATCTCGAGATGGTTCGACTTTTGGCGAAGCTGC	<i>XhoI</i>	pET31b(+)	<i>capA</i>
3'-capA_2	ATATCTCGAGTTAATTGAACCCGAAGCGCGAAATGACG	<i>XhoI</i>		

Material				
5'-capA_3	GGAATTCATATGGTTCGACTTTTGGCG AAGCTGC	<i>NdeI</i>	pSCrhaB2	<i>capA</i>
3'-capA_3	CGTGAAGCTTCTCGAGTTAATTGAACCC GAAGCGCGAAATGACG	<i>HindIII</i>		
5'-capA_G1A	CGGTTTCCTCGACGCACGCCACCCCGGG TTTCCAAAC	Mutagenese ¹	pCDFDuet	<i>capA_G1A</i>
3'-capA_G1A	GTTTGGAAACCCGGGGTGGCGTGCCTCG AGGAAACCG			
5'-capA_KAA	[Phos] AAGGCCGGGGCCAATTAACCTCG AGTCTGGTAAAGAAACCGCTGC	Mutagenese ²	pCDFDuet	<i>capA_KAA</i>
3'-capA_KAA	[Phos] CGAAATGACGCGAGCGTCCGGG			
5'-capB_1	ATATCATATGCAACGGTCGCGCTATTTT CTTTACG	<i>NdeI</i>	pET28a(+), pETDuet	<i>capB</i>
3'-capB_1	ATATCTCGAGTCAAGCCGCCAGCCCGAA CG	<i>XhoI</i>		
5'-capB_2	ATATCCATGGCACAACGGTCGCGCTATT TTCTTTACGAC	<i>NcoI</i>	pET41a(+) pETMBP, pETNusA	<i>capB</i>
3'-capB_2	ATATAAGCTTTCAAGCCGCCAGCCCGAA CG	<i>HindIII</i>		
5'-capC_1	ATATCATATGGCGAAATCTATCGAACGC CGC	<i>NdeI</i>	pET28a(+)	<i>capC</i>
3'-capC_1	ATATAAGCTTTTCAGCATACCGCGCGTG CC	<i>XhoI</i>		
5'-capC_2	ATATCCATGGACGCGAAATCTATCGAAC GCCGCGAC	<i>NcoI</i>	pET41a(+) pETDuet, pETMBP, pETNusA	<i>capC</i>
3'-capC_2	ATATAAGCTTTTCAGCATACCGCGCGTG CC	<i>HindIII</i>		
5'-capD	ATATCCATGGCCCTTCCCATCCGAAACG	<i>NcoI</i>	pCDFDuet	<i>capD</i>
3'-capD	ATATGAATTCTCAGCCTTCGCGTCGGC	<i>EcoRI</i>		
5'-capD_BD	ATATGGATCCGGGCGGCGCTCGCGCA GC	<i>BamHI</i>	pCDFDuet	<i>capD</i> (ATP-BD)
3'-capD_BD	ATATAAGCTTTTCAGCCTTCGCGTCGGC GGGTTC	<i>HindIII</i>		
5'-capABCD	GCACATATGGTTCGACTTTTGGCGAAGC TGCTTCGTTCGACG	<i>NdeI</i>	pET41a(+)	<i>capABCD</i>
3'-capABCD	ATACCATGGTCACGCCTTCGCGTCGGCG GGTTCGGG	<i>NcoI</i>		
5'-mcjA_RGD	GCAGGACATGTGCCTGAGTATTTTGTGC GGGGTGATACACCTATATCTTTCTATGG CTG	Mutagenese	pTUC202	<i>mcjA_RGD</i>
3'-mcjA_RGD	CAGCCATAGAAAGATATAGGTGTATCAC CCCGCACAAAATACTCAGGCACATGTCC TGC			

¹ Beispiel für komplementäre Primer, die zur Mutagenese nach der QuickChange-Methode eingesetzt wurden.

² Beispiel für ein phosphoryliertes Primerpaar, das zur Mutagenese nach der blunt end-Ligationsmethode verwendet wurde.

2.5 Mikroorganismen

2.5.1 *Escherichia coli* TOP10

E. coli TOP10 (Invitrogen) wurde standardmäßig für Klonierungsarbeiten sowie zur Amplifikation von Plasmid-DNA zu Sequenzierungszwecken verwendet. Der Stamm besitzt folgenden Genotyp: $F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \phi80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str^R) endA1 nupG \lambda^-$.

2.5.2 *Escherichia coli* NEB 10-beta

E. coli NEB 10-beta (New England Biolabs) wurde zur Herstellung von Mutanten mittels ortsgerichteter Mutagenese verwendet und verfügt über folgenden Genotyp: $araD139 \Delta(ara-leu)7697 fhuA lacX74 galK16 galE15 mcrA \phi80lacZ\Delta M15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL(Str^R) rph spoT1\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$.

2.5.3 *Escherichia coli* BL21(DE3)

Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) (Invitrogen) mit dem Genotyp $F^- ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B^- m_B^-) \lambda(DE3)$ wurde als bakterieller Wirtsorganismus zur heterologen Expression plasmidkodierter-DNA verwendet. Durch den Knockout der Proteasen Lon und OmpT wird die Halbwertszeit der rekombinant exprimierten Proteine erhöht, was höhere Ausbeuten zur Folge hat. Desweiteren besitzt der Stamm eine Insertion innerhalb des *int* Gens, die das *lacI* Gen, den *lacUV5* Promotor und das Gen für die T7 Polymerase trägt. Die Transkription der T7 Polymerase kann durch Zugabe von IPTG induziert werden, woraufhin die Expression von plasmidkodierten Genen, die unter Kontrolle eines T7 Promotors stehen, durchgeführt werden kann.

2.5.4 *Burkholderia thailandensis* E264

Burkholderia thailandensis E264 (DSM 13276) ist ein aerobes, Gram-negatives, peritrich begeißeltes β -Proteobakterium, das aus einer Reisfeldbodenprobe in Thailand isoliert wurde [155]. Gemäß den Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA) ist der Stamm in die Risikogruppe 1 eingestuft worden. *B. thailandensis* E264 wurde zur Isolierung chromosomaler DNA, zur Naturstoffextraktion und zur homologen Produktion von Capistruinvarianten kultiviert.

2.5.5 *Streptomyces* sp. (DSM 14996)

Streptomyces sp. (DSM 14996) ist ein Stamm der Risikogruppe 1 und wurde zur Isolierung von BI-32169 fermentiert [121]. Der Stamm wurde aus der Patentstammsammlung der DSMZ erworben.

2.5.6 *Streptomyces coeruleus*

Streptomyces coeruleus (DSMZ 4778) wird als Stamm der Risikogruppe 1 klassifiziert und wurde zur Isolierung von Anantin fermentiert [117]. Der Anantin-Produzent wurde aus der Patentstammsammlung der DSMZ erworben.

2.6 Kulturmedien

Die aufgeführten Kulturmedien wurden zur Fermentation der in Abschnitt 2.5 beschriebenen Mikroorganismen verwendet. Zur Herstellung eines Festmediums wurde zusätzlich Agar Nr. 1 in einer Konzentration von 1.5% (w/v) vor dem Autoklavieren (121 °C, 1.5 bar, 20 min) zugegeben. Die zur Selektion verwendeten Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren dem abgekühlten Medium ($T < 55\text{ °C}$) in folgenden Konzentrationen zugeführt: Ampicillin 100 µg/mL, Chloramphenicol 34 µg/mL, Kanamycin 50 µg/mL, Spectinomycin 100 µg/mL, Trimethoprim 100 µg/mL.

2.6.1 LB-Medium

LB-Medium wurde als Standardmedium zur Kultivierung von *E. coli* und *B. thailandensis* E264 eingesetzt.

Bactotrypton	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
Natriumchlorid	5 g/L
pH-Wert	7.0

2.6.2 M9-Medium

Zum Screening der optimalen Wachstumsbedingungen im Hinblick auf die homologe und heterologe Capistruinproduktion wurden *B. thailandensis* E264 und *E. coli* in M9-Minimalmedium fermentiert. Die mit einem Stern gekennzeichneten Komponenten wurden erst nach dem Autoklavieren unter Verwendung steril filtrierter Stammlösungen zugegeben. Bei der Kultivierung von *E. coli* wurden zusätzlich 2 µg/mL Biotin und Thiamin nach dem Autoklavieren zugesetzt.

Dinatriumhydrogenphosphat	6 g/L
Kaliumdihydrogenphosphat	3 g/L
Ammoniumchlorid	1 g/L
Natriumchlorid	0.5 g/L
Glucose*	2 g/L
Magnesiumsulfat*	0.12 g/L
Calciumchlorid*	0.01 g/L
pH-Wert	7.0

2.6.3 M20-Medium

Zur homologen und heterologen Produktion von Capistruin und Capistruinvarianten in *E. coli* BL21(DE3) und *B. thailandensis* E264 wurde M20-Medium verwendet. Bei der Kultivierung von *E. coli* wurden zusätzlich 2 µg/mL Biotin und Thiamin nach dem Autoklavieren zugesetzt.

L-Glutaminsäure	20 g/L
Dinatriumhydrogenphosphat	20 g/L
Natriumcitrat	1 g/L
Kaliumchlorid	0.5 g/L
Natriumsulfat	0.5 g/L
L-Alanin	0.2 g/L
Magnesiumchlorid	0.2 g/L
Eisensulfat	0.01 g/L
Calciumchlorid	0.0076 g/L
Mangansulfat	0.0076 g/L
pH-Wert	7.0

2.6.4 M63-Medium

E. coli Stämme, die das pTUC202 Plasmid tragen, wurden zur Produktion von Microcin J25 und dessen Varianten in M63-Medium fermentiert [156]. Die mit einem Stern gekennzeichneten Komponenten wurden erst nach dem Autoklavieren unter Verwendung steril filtrierter Stammlösungen zugegeben.

Kaliumdihydrogenphosphat	13.6 g/L
Ammoniumsulfat	2 g/L
Bactotrypton	1 g/L
Glucose*	2 g/L
Magnesiumsulfat*	0.25 g/L
Biotin*	0.002 g/L
Thiamin*	0.002 g/L
pH-Wert	7.0

2.6.5 PB-Medium

Poor broth (PB)-Medium wurde als Wachstumsmedium zur Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration von Capistruin eingesetzt.

Bactotrypton	10 g/L
Natriumchlorid	5 g/L
pH-Wert	7.4

2.6.6 BI-Medium

Streptomyces sp. (DSM 14996) wurde zur Isolierung von BI-32169 in BI-Medium kultiviert [121]. Die mit einem Stern gekennzeichnete Komponente wurde erst nach dem Autoklavieren unter Verwendung einer steril filtrierten Stammlösung zugegeben.

Natriumchlorid	5 g/L
Caseinpepton	4 g/L
Fleischextrakt	4 g/L
Calciumcarbonat	3 g/L
Hefeextrakt	0.5 g/L
Glucose*	20 g/L
pH-Wert	7.2

2.6.7 SCM-Medium

Streptomyces coeruleus (DSM 4778) wurde zur Isolierung von Anantin in SCM-Medium kultiviert [117]. Die mit einem Stern gekennzeichnete Komponente wurde erst nach dem Autoklavieren unter Verwendung einer steril filtrierten Stammlösung zugegeben.

Malzextrakt	10 g/L
Hefeextrakt	4 g/L
Glucose*	4 g/L
pH-Wert	7.2

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von *Burkholderia thailandensis* E264 und Präparation chromosomaler DNA

Zur Präparation chromosomaler DNA wurden 2 mL einer Übernachtskultur (LB-Medium, 8 µg/mL Gentamycin) durch Zentrifugation pelletiert (13000 rpm, 10 min, RT). Das Zellpellet wurde in 1 mL TE-Puffer (10 mM TRIS/HCl, 1 mM EDTA, pH 7.0) resuspendiert und erneut zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, RT). Anschließend wurde das Zellpellet in 300 µL TE-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 6 µL Lysozymlösung (100 mg/mL) bei 37 °C 10 min inkubiert. Danach wurden 100 µL 10% aq. SDS, 100 µL 5 M NaClO₄ und 500 µL CHCl₃/Isoamylalkohol (24:1/v:v) zugegeben und 20 s vortexiert. Anschließend wurde zentrifugiert (13000 rpm, 5 min, RT) und die wässrige Phase in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden 800 µL kalter (4 °C) 96% aq. Ethanol zugegeben und vorsichtig gemischt, um die chromosomale DNA auszufällen. Die sichtbare chromosomale DNA wurde mittels einer Pipettenspitze in 200 µL 70% aq. Ethanol überführt, mehrere Male mit 70% aq. Ethanol gewaschen und bei 37 °C getrocknet. Die chromosomale DNA wurde im Anschluss durch Zugabe von 100 µL EB-Puffer (10 mM TRIS/HCl, pH 8.5) bei 37 °C resuspendiert und RNA-Verunreinigungen wurden durch Zugabe von 1 µL Ribonuklease A-Lösung (10 mg/mL) und einstündiger Inkubation bei 37 °C entfernt.

3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden 5 mL LB-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Anschließend wurden 2 mL der Übernachtskultur in einem Reaktionsgefäß pelletiert (13000 rpm, 10 min, RT) und das Pellet in 250 µL Puffer P1 (50 mM TRIS/HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNase A) resuspendiert. Daraufhin wurden 250 µL Puffer P2 (200 mM aq. NaOH, 1% (w/v) SDS) zugegeben, durch Invertieren des Reaktionsgefäßes vorsichtig vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 350 µL Puffer P3 (2.55 M aq. KOAc, pH 4.8) zugeführt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 10 min, RT) wurde der Überstand in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt, mit 600 µL kaltem Isopropanol (4 °C) versetzt und erneut zentrifugiert (13000 rpm, 30 min, 4 °C), um die Plasmid-DNA zu pelletieren. Das Pellet wurde anschließend mit 100 µL 70% aq. EtOH gewaschen, bei 37 °C für 30 min getrocknet und in 50 µL EB-Puffer resuspendiert.

3.1.3 Konstruktion der Expressionsplasmide

Die Konstruktion der Expressionsplasmide erfolgte in Anlehnung an Standardprotokolle [157]. Die zu klonierenden Gene, Genfragmente oder Gencluster wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung der Phusion Polymerase (New England Biolabs) den Herstellerangaben

entsprechend amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden im Anschluss an eine Agarosegelelektrophorese mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) gereinigt. Der Verdau der gereinigten Amplifikate mit Restriktionsendonukleasen und die anschließende Ligation mit den linearisierten Vektoren wurde den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt (New England Biolabs). Ligationsansätze wurden in *E. coli* TOP10-Zellen durch Elektroporation bei 2.5 kV transformiert und die Transformanten auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum selektiert. Die Plasmide wurden wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben präpariert und mit Hilfe von Restriktionskartierung und DNA-Sequenzierung (GATC Biotech) verifiziert. Anschließend wurden die verifizierten Plasmide entsprechend den Protokollen des Herstellers in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen (Invitrogen) transformiert.

3.1.4 Ortsgerichtete Mutagenese

Mutationen wurden entweder nach der QuickChange-Methode (Stratagene) oder mit Hilfe einer *blunt end*-Ligation in eine DNA-Sequenz eingeführt. In beiden Fällen wurde die Phusion Polymerase (New England Biolabs) in HF-Puffer in Gegenwart von 5% DMSO verwendet.

Bei der QuickChange-Methode wurden als Primer zwei komplementäre Oligonukleotide bestehend aus ~35 Nukleotiden eingesetzt, die die Mutationsstelle in ihrer Mitte enthielten. Nach der PCR wurde das Amplifikat mittels einer Gelextraktion (QIAquick Gel Extraction Kit) gereinigt und anschließend in einer 50 µL Reaktion mit 1 µL *DpnI* (5000 U/mL) in NEBuffer 4 (50 mM Kaliumacetat, 20 mM TRIS/Acetat, 10 mM Magnesiumacetat, 1 mM DTT, pH 7.9) 1.5 h bei 37 °C inkubiert, um die methylierte Templat-DNA zu verdauen. Im Anschluss wurden 5 µL des Reaktionsansatzes in hitzekompetente *E. coli* NEB 10-beta-Zellen (New England Biolabs) gemäß dem Transformationsprotokoll des Herstellers transformiert und auf LB-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum selektiert. Nach der Präparation der Plasmide (siehe Abschnitt 3.1.2) wurde die Mutagenese durch Restriktionskartierung und DNA-Sequenzierung (GATC Biotech) verifiziert und die Plasmide in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen (Invitrogen) transformiert.

Zur Einführung mehrerer Mutationen in einem engen Sequenzbereich wurde ein Verfahren basierend auf einer *blunt end*-Ligation angewendet. Als Primer fanden zwei 5'-phosphorylierte Oligonukleotide Verwendung, die das Templatplasmid auf der 5'-Seite der Mutationsstelle ohne Sequenzverlust linearisierten, wobei der Forward-Primer am 5'-Ende die modifizierte Sequenz enthielt. Das Amplifikat wurde nach der PCR durch eine Gelextraktion (QIAquick Gel Extraction Kit) gereinigt und wie bereits beschrieben einem *DpnI*-Verdau unterzogen. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Quiagen) gereinigt und mittels der T4 DNA Ligase (New England Biolabs) intramolekular ligiert. Die darauf folgende Transformation und Plasmidverifizierung wurde wie bereits beschrieben durchgeführt.

3.1.5 Elektrotransformation von *B. thailandensis* E264

Zur Herstellung elektrokompetenter *B. thailandensis* E264-Zellen wurden 300 mL LB-Medium in einem 1 L Kulturkolben mit 300 µL einer Übernachtskultur inokuliert und bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Die Zellen wurden bei einer OD₆₀₀ von 0.5 durch Zentrifugation (6000 rpm, 15 min, 4 °C)

geerntet und zweimal mit 300 mL sterilem ddH₂O gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen zunächst mit 6 mL sterilem 10% aq. Glycerol gewaschen und dann in 300 µL 10% aq. Glycerol resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu 50 µL aliquotiert und entweder direkt zur Elektrottransformation eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Elektrottransformation wurden 1 µg Plasmid-DNA (pSCrhaB2-Konstrukte) zu 50 µL Zellen gegeben und durch Elektroporation bei 2.5 kV transformiert. Anschließend wurden 350 µL vorgewärmtes LB-Medium (37 °C) zu den transformierten Zellen gegeben und diese bei 37 °C und 400 rpm im Heizschüttler für 2 h zur Ausbildung der Resistenz inkubiert. Daraufhin wurden unterschiedliche Volumina (z.B. 30 µL und 300 µL) der Zellsuspension auf LB-Agarplatten (100 µg/mL Trimethoprim) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2 Proteinchemische Methoden

Die Standardtechniken der Proteinanalytik wurden nach Laemmli und Benett durchgeführt [158,159].

3.2.1 Genexpression

3.2.1.1 Expression von pET28a(+)-, pET41a(+)-, pETMBP_1a-, pETNus_1a-, pETSUMO-, und pBAD102-Vektoren

Die Expressionen wurden durchgeführt, indem 500 mL LB Medium (50 µg/mL Kanamycin bzw. 100 µg/mL Ampicillin im Falle der pBAD102-Vektoren) in einem 2 L Kulturkolben mit Schikane mit 5 mL einer Übernachtskultur des Expressionsstammes inokuliert wurden. Insgesamt wurden im präparativen Maßstab 5 L LB-Medium verwendet. Die inokulierten Kulturkolben wurden bis zu einer optischen Dichte (OD) von ~0.3 ($\lambda = 600$ nm) bei 37 °C und 240 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Temperatur auf 16 °C reduziert und die Proteinexpression durch Zugabe von 0.1 mM IPTG (pBAD102: 0.02% Arabinose) bei einer OD₆₀₀ von 0.6 induziert. Daraufhin wurden die induzierten Kulturen ca. 18 h bei 16 °C und 240 rpm fermentiert und durch Zentrifugation (6000 rpm, 20 min, 4 °C) pelletiert. Die vereinten Pellets wurden (falls nicht anders vermerkt) in 50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, pH 8.0 resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

3.2.1.2 Expression von *capA* als KSI-Fusionsprotein

Zur Expression des Fusionsproteins KSI-CapA wurde der Vektor pET31b(+)_{capA} verwendet. 500 mL LB-Medium (50 µg/mL Kanamycin) in einem 2 L Kulturkolben mit Schikane wurde mit 5 mL einer entsprechenden Übernachtskultur inokuliert und bei 37 °C und 240 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 inkubiert. Anschließend wurde die Expression des Fusionsproteins durch 1 mM IPTG induziert und für weitere 18 h bei 37 °C und 240 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation (6000 rpm, 20 min, 4 °C) geerntet, die Pellets in 50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, pH 8.0 resuspendiert und bei -20 °C gelagert. Für eine präparative Expression wurden 3 L LB-Medium eingesetzt.

3.2.1.3 Heterologe Produktion von Capistruin unter Verwendung des pET41a(+)_capABCD-Vektors

Um Capistruin heterolog in *E. coli* zu produzieren, wurden 300 mL M20-Medium in 1 L Kulturkolben mit 2 µg/mL Thiamin/Biotin und 50 µg/mL Kanamycin versetzt und mit 600 µL einer Übernachtskultur des Produzentenstammes inokuliert. Die inokulierten Kulturkolben wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0.8-1.0 bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Daraufhin wurde die Expression des capABCD-Genclusters mit 0.05 mM IPTG induziert und die Kulturen für weitere 18 - 42 h fermentiert. Anschließend wurden die Kulturen durch Zentrifugation (6000 rpm, 20 min, 4 °C) pelletiert und die Zellpellets und Kulturüberstände wie in Abschnitt 3.3 beschrieben extrahiert.

3.2.1.4 Heterologe Produktion von Capistruinvarianten unter Verwendung der Vektoren pET41a(+)_capA^{*}BCD und pCDFDuet_capA[#]

Die heterologe Produktion von Capistruinvarianten erfolgte analog zu Abschnitt 3.2.1.3 mit der einzigen Ausnahme, dass zusätzlich 100 µg/mL Spectinomycin dem M20-Medium zugesetzt wurde, da die entsprechenden Produktionsstämme neben dem pET41a(+)_capA^{*}BCD-Vektor noch den pCDFDuet_capA[#]-Vektor enthielten.

3.2.1.5 Homologe Produktion von Capistruinvarianten in *B. thailandensis* E264 mittels des pSCrhaB2-Vektors

Um Capistruinvarianten homolog in *B. thailandensis* zu produzieren, wurden 300 mL M20-Medium in einem 1 L Kulturkolben mit 100 µg/mL Trimethoprim versetzt, mit 600 µL einer Übernachtskultur des Produzentenstammes inokuliert und bei 42 °C und 250 rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0.6 wurde die Expression des mutierten Vorläuferproteins mit 0.02% Rhamnose induziert und die Zellen für weitere 24 h bei 42 °C und 250 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen durch Zentrifugation (6000 rpm, 20 min, 4 °C) pelletiert und die Kulturüberstände wie in Abschnitt 3.3 beschrieben extrahiert.

3.2.1.6 Homologe Produktion von Microcin J25 und Derivaten in *E. coli* mit Hilfe des pTUC202-Vektors

Die Produktion von Microcin J25 und dessen Varianten in *E. coli* DH5α erfolgte in Anlehnung an beschriebene Verfahren [156]. Dazu wurden 500 mL M63-Medium in einem 2 L Kulturkolben mit Schikane mit 2 µg/mL Thiamin/Biotin, 0.02% Glucose und 34 µg/mL Chloramphenicol versetzt, mit 5 mL einer Übernachtskultur des Produzentenstammes inokuliert und bei 37 °C und 250 rpm für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (6000 rpm, 20 min, 4 °C) pelletiert und die Kulturüberstände extrahiert (siehe Abschnitt 3.3). Es wurden jeweils 5 L M63-Medium für eine Fermentation verwendet.

3.2.2 Proteinreinigung

Alle Proteinreinigungen, die auf der Verwendung von affinitätschromatographischen Methoden basierten, wurden mit Hilfe einer FPLC-Anlage (Amersham Biosciences) durchgeführt.

3.2.2.1 Zellaufschluss und Probenvorbereitung

Die Zellsuspensionen wurden in kaltem Wasser aufgetaut und mit Hilfe des Fluidizers EmulsiFlex-C5 (Avestin) aufgeschlossen. Dabei wurden die Zellen insgesamt dreimal durch die mit Eiswasser vorgekühlte Apparatur geschleust. Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile wurden im Anschluss durch Zentrifugation (17000 rpm, 45 min, 4 °C) abgetrennt und der Überstand unter Verwendung eines 0.45 µm Filters filtriert.

3.2.2.2 Reinigung von Proteinen mit einem His(6)-Tag

Proteine mit einem N- oder C-terminalen His(6)-Tag wurden mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Ni^{2+} -NTA-Säule wurde zunächst mit 4% Puffer B (Puffer A: 50 mM Na_2HPO_4 , 300 mM NaCl, pH 8.0; Puffer B: 50 mM Na_2HPO_4 , 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 8.0) bei einer Flussrate von 1 mL/min äquilibriert. Anschließend wurde der filtrierte Überstand (siehe Abschnitt 3.2.2.1) auf die äquilibrierte Säule mit einer Flussrate von 0.7 mL/min aufgetragen und die Säule mit 4% Puffer B gewaschen bis die Absorption des Durchflusses bei 280 nm (A_{280}) eine Basislinie erreichte. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit Hilfe eines linearen Gradienten von 4% bis 50% Puffer B bei einer Flussrate von 1 mL/min in 35 min und das Eluat wurde in 4 mL Fraktionen gesammelt. Zusätzlich zum A_{280} -Signal wurden die Fraktionen mittels eines qualitativen Bradford-Tests [160] analysiert. Die Reinheit und Identität einzelner Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE untersucht. Fraktionen, die das gewünschte rekombinante Protein in hoher Reinheit enthielten, wurden vereinigt, mit Hilfe von Amicon Ultra-15 Konzentratoren aufkonzentriert und durch HiTrap-Desalting-Säulen in 25 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.0 umgepuffert. Die Proteinlösungen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2.2.3 Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Proteine mit einer N-terminalen GST-Fusion wurden mit einer Affinitätschromatographie unter Verwendung einer Glutathion-Sepharose-Matrix (GSTrap HP Säule) gereinigt. Die Säule wurde mit Bindungspuffer (25 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.0) bei einer Flussrate von 1 mL/min äquilibriert und anschließend der filtrierte Überstand (siehe Abschnitt 3.2.2.1) mit einer Flussrate von 0.2 mL/min auf die Säule gegeben. Im Anschluss wurde die Säule mit Bindungspuffer bis zum Erreichen einer A_{280} -Basislinie gewaschen. Die Elution erfolgte mit Elutionspuffer (50 mM TRIS/HCl, 20 mM Glutathion, pH 8.0) bei einer Flussrate von 1 mL/min. Es wurden Fraktionen mit einer Größe von 2 mL gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert. Fraktionen, die das GST-Fusionsprotein in hoher Reinheit enthielten, wurden vereinigt, aufkonzentriert und in 25 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl,

pH 7.0 umgepuffert. Die Proteinlösungen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2.2.4 Reinigung von MBP-Fusionsproteinen

MBP-Fusionsproteine wurden durch eine Amylose-Affinitätschromatographie gereinigt. Dafür wurde zunächst die Amylose-Säule mit Säulenpuffer (20 mM TRIS/HCl, 200 mM NaCl, 10 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM EDTA, pH 7.4) äquilibriert und anschließend der filtrierte Überstand (siehe Abschnitt 3.2.2.1) mit einer Flussrate von 1 mL/min aufgetragen. Die Säule wurde mit Bindungspuffer bis zum Erreichen einer A_{280} -Basislinie gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit einem 10 mM Maltose enthaltenden Säulenpuffer eluiert und in Fraktionen von 2 mL gesammelt. Nach Analyse mittels SDS-PAGE wurden die Fraktionen, die das MBP-Fusionsprotein enthielten, vereinigt und aufkonzentriert. Anschließend wurde in 25 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.0 umgepuffert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2.2.5 Reinigung von NusA-Fusionsproteinen

Die NusA-Fusionsproteine verfügen über einen N-terminalen His(6)-Tag, der eine Reinigung mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie erlaubt. Im Falle der NusA-Fusionsproteine von CapB und CapC wurde allerdings keine Bindung an das Säulenmaterial beobachtet. Dies kann darin begründet liegen, dass die His(6)-Tags nicht exponiert vorlagen. Daher wurden beide Fusionproteine mittels einer Anionenaustauschchromatographie gereinigt. Zunächst wurde eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Dazu wurden 176 mg Ammoniumsulfat pro mL Lösung zu dem filtrierten Überstand unter Rühren zugegeben, was einer Sättigung von 30% entspricht. Nach einstündigem Rühren bei 4 °C wurde der Niederschlag durch Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 15 min) pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und der Vorgang jeweils durch Zugabe von 198 mg (60% Sättigung) bzw. 227 mg (90% Sättigung) pro mL Lösung wiederholt. Die drei resultierenden Pellets wurden jeweils mit 30 mL 30%, 60% bzw. 90% Ammoniumsulfatlösung gewaschen, durch Zentrifugation erneut pelletiert (13000 rpm, 4 °C, 15 min) und anschließend in 40 mL 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, pH 8.0 aufgenommen und mittels SDS-PAGE auf das Vorliegen des Fusionsproteins hin analysiert. Die entsprechende Fraktion wurde daraufhin mit 1 μL Benzonase (250 U/ μL) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Zur Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie wurde die 5 mL HiTrap Q FF-Säule (GE Healthcare) zunächst mit 10% Puffer B (Puffer A: 20 mM TRIS/HCl, 5 mM DTT, pH 8.0; Puffer B: 20 mM TRIS/HCl, 5 mM DTT, 1 M NaCl, pH 8.0) mit einer Flussrate von 5 mL/min äquilibriert. Anschließend wurde die Benzonase-behandelte Fraktion mit 5 mL/min auf die Säule aufgetragen und mit 10% Puffer B bis zum Erreichen einer Basislinie der Absorption bei 280 nm gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit einem linearen Gradienten von 10% auf 100% Puffer B in 30 min bei einer Flussrate von 5 mL/min. Es wurden Fraktionen mit einer Größe von 5 mL gesammelt und diese anschließend anhand von SDS-PAGE untersucht. Fraktionen, die das NusA-Fusionsprotein enthielten, wurden

vereinigt und aufkonzentriert. Anschließend wurde in 25 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, pH 7.0 umgepuffert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2.3 Präparation von *inclusion bodies* und Bromcyanspaltung von KSI-Fusionsproteinen

Die unlöslichen KSI-Fusionproteine wurden mit Hilfe einer *inclusion body*-Präparation gereinigt und anschließend wurde eine Bromcyanspaltung zur Abspaltung der KSI-Fusion durchgeführt. Dazu wurden nach dem Zellaufschluss mit Hilfe des Fluidizers die *inclusion bodies* durch Zentrifugation (15000 rpm, 4 °C, 20 min) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 25 mL Waschpuffer (10 mM TRIS/HCl, 1 mg/mL Natriumdeoxycholat, 1 mM EDTA, pH 8.0) resuspendiert und nach Zugabe von 0.2 mg/mL Lysozym 30 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurde erneut zentrifugiert (15000 rpm, 4 °C, 10 min). Die *inclusion bodies* wurden noch jeweils zweimal mit 25 mL Waschpuffer und 25 mL Lysepuffer (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, pH 8.0) gewaschen und zentrifugiert. Im Anschluss wurden die *inclusion bodies* in 50 mM Na₂HPO₄, 6 M GdmCl, pH 8.0 gelöst und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (15000 rpm, 4 °C, 10 min) abgetrennt. Die KSI-Fusionsproteine wurden durch sechsfache Verdünnung in ddH₂O gefällt und durch Zentrifugation (4000 rpm, 4 °C, 10 min) pelletiert. Die Präparation wurde mittels SDS-PAGE analysiert und die vereinten Proteinpellets bei -20 °C gelagert.

Zur Spaltung des KSI-Fusionsproteins wurde das wasserunlösliche Proteinpellet in 30 mL 70% aq. Ameisensäure gelöst und in einen mit Stickstoff gefüllten 100 mL Rundkolben überführt. Anschließend wurden 4 mL einer 5 M Bromcyanlösung in Acetonitril im Gegenstrom zugegeben und über Nacht im Dunkeln bei RT gerührt. Das Lösungsmittel und der Bromcyanüberschuss wurden unter reduziertem Druck entfernt, der Rückstand in 30 mL 40% aq. Acetonitril resuspendiert und 1 h bei RT gerührt. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation (4000 rpm, 20 °C, 15 min) abgetrennt und der Überstand mittels präparativer RP-HPLC (siehe Abschnitt 3.2.4) gereinigt.

3.2.4 Reinigung von Peptiden durch präparative RP-HPLC

Die untersuchten Lassoptide und das Capistruinvorläuferprotein CapA wurden mittels präparativer *reversed phase* (RP)-HPLC gereinigt. Die verwendete Nucleodur 250/12 C18ec-Säule wurde jeweils mit der Anfangskonzentration von Acetonitril bzw. Methanol 15 min äquilibriert bevor die Probe appliziert wurde. Dabei fanden die in Tabelle 3.1 beschriebenen Gradienten zur Reinigung der Peptide Anwendung. Die Auftrennung wurde kontinuierlich anhand der Absorption bei 215 und 280 nm verfolgt und es wurden Fraktionen in 0.5 min Intervallen gesammelt. Unter Berücksichtigung der Absorptionssignale wurden ausgewählte Fraktionen mittels MALDI-MS analysiert. Fraktionen, die das entsprechende Peptid in hoher Reinheit enthielten, wurden vereinigt und lyophilisiert.

Tabelle 3.1: Verwendete Gradienten zur Reinigung der Peptide mittels präparativer RP-HPLC.

Peptid/Protein	Lösungsmittelsystem	Flussrate	Gradient	
Capistruin	A: H ₂ O/0.1% TFA B: CH ₃ CN/0.1% TFA	18 mL/min	10% - 40% B	30 min
			40% - 95% B	5 min
			95% B	2 min
BI-32169/Anantin	A: H ₂ O/0.1% TFA B: CH ₃ OH/0.1% TFA	16 mL/min	10% - 95% B	36 min
			95% B	5 min
MccJ25	A: H ₂ O/0.1% TFA B: CH ₃ OH/0.1% TFA	18 mL/min	40% - 65% B	30 min
			65% - 95% B	5 min
			95% B	1 min
MccJ25_RGD	A: H ₂ O/0.1% TFA B: CH ₃ OH/0.1% TFA	18 mL/min	40% - 55% B	30 min
			55% - 95% B	5 min
			95% B	1 min
CapA	A: H ₂ O/0.1% TFA B: CH ₃ CN/0.1% TFA	16 mL/min	5% - 50% B	30 min
			50% - 95% B	5 min
			95% B	2 min

3.3 Naturstoffisolierung

3.3.1 Methanolextraktion

Methanolextraktion von *E. coli* Zellen. Um zu untersuchen, ob Capistruin oder Capistruinvarianten intrazellulär vorlagen, wurden die Zellpellets der Produzentenstämme mit Methanol extrahiert. Dazu wurde das Zellpellet einer 300 mL Expression (siehe Abschnitt 3.2.1.4) in 100 mL Methanol resuspendiert und 1 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde zentrifugiert (6000 rpm, 20 min, 4 °C), der Methanolüberstand dekantiert und das Pellet ein weiteres Mal mit 100 mL Methanol extrahiert. Die Methanolüberstände wurden filtriert, vereinigt und mit Hilfe eines Rotationsverdampfers zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 20% Methanol aufgenommen und mittels HPLC-MS analysiert.

Methanolextraktion des Myceliums von *Streptomyces* sp. (DSM 14996). Die Methanolextraktion des Myceliums von *Streptomyces* sp. (DSM 14996) wurde in Anlehnung an das publizierte Verfahren durchgeführt [121]. Das Mycelium einer 4 L Fermentation wurde zweimal mit jeweils 750 mL Methanol extrahiert, zu dem 3.5 mL DMSO addiert wurden. Der Extrakt wurde zur Trockne eingedampft, in einer Mischung aus 20 mL Methanol und 4 mL DMSO gelöst und mit Hilfe einer präparativen RP-HPLC aufgetrennt.

3.3.2 Festphasenextraktion der Kulturüberstände mit XAD16

Zur Festphasenextraktion der Kulturüberstände wurde das hydrophobe, polyaromatische Adsorberharz XAD16 (Sigma-Aldrich) verwendet. Dazu wurden ~5 g des Harzes zu einem Liter Kulturüberstand gegeben und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Harz durch Filtration vom Überstand getrennt, mit 100 mL ddH₂O gewaschen und die adsorbierten Verbindungen mit 100 mL

Methanol vom Harz eluiert. Der Methanolextrakt wurde zur Trockne eingedampft, in 20% Methanol wieder aufgenommen und mittels HPLC-MS analysiert oder mit präparativer RP-HPLC aufgetrennt.

3.4 Analytische Methoden

3.4.1 MALDI-MS

Die Matrix-unterstützte-Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (engl. matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, MALDI-MS) wurde zum Screening einzelner Fraktionen einer präparativen RP-HPLC-Aufreinigung eingesetzt. Dazu wurden 1 µL DHB-Matrixlösung (Agilent Technologies) mit 1 µL Probe gemischt, auf den metallischen Probenträger pipettiert und bei RT kokristallisiert. Anschließend wurden die Kokristalle mit Hilfe eines Bruker Biflex III Systems analysiert.

3.4.2 HPLC-MS

Die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (engl. high performance liquid chromatography mass spectrometry, HPLC-MS) wurde verwendet, um die bearbeiteten Peptide anhand ihrer Retentionszeit und ihrer molekularen Masse zu charakterisieren. Dabei wurde die sogenannte Reversed-Phase-Chromatographie (RPC) angewendet, die auf der hydrophoben Wechselwirkung der Analyten mit einer nicht-polaren stationären Phase (z.B. C₁₈-substituiertes Silicagel) im polaren, wässrigen Lösungsmittel beruht. Die Elution erfolgte mit Hilfe des unpolaren, organischen Lösungsmittels Acetonitril, das mit den adsorbierten Molekülen um die Bindungsstellen konkurriert. Die Retentionszeiten der Analyten wurden anhand der Absorption bei 215 nm mit Hilfe eines UV-VIS-Detektors bestimmt. Die Kopplung des verwendeten Agilent 1100 HPLC-System mit einem LTQ-FT-Massenspektrometer erlaubte eine exakte Massenbestimmung der Analyten mit einer Massengenauigkeit von 2 ppm. Zur Verbesserung der Ionisation der Analyten wurde den Laufmitteln 0.5% Ameisensäure als Ionenpaarreagenz zugesetzt. Für alle durchgeführten Analysen wurde eine Nucleodur 125/2 C18ec-Säule bei einer Säulentemperatur von 40 °C eingesetzt und das Probenvolumen der applizierten Probe betrug zwischen 5 und 100 µL. Die verwendeten Gradienten sind in Tabelle 3.2 gezeigt.

Tabelle 3.2: Verwendete Gradienten zur HPLC-MS-Analytik.

Peptid	Lösungsmittelsystem	Flussrate	Gradient	
Capistruin	A: H ₂ O/0.05% HCOOH B: CH ₃ CN/0.045% HCOOH	0.2 mL/min	10% - 40% B	30 min
			40% - 95% B	5 min
			95% B	2 min
BI-32169	A: H ₂ O/0.05% HCOOH	0.2 mL/min	10% - 95% B	35 min
MccJ25	B: CH ₃ CN/0.045% HCOOH		95% B	2 min
Anantin				

3.4.3 CID-Fragmentierungsstudien

Zur Analyse der Sequenz und Konformation der untersuchten Peptide wurden Fragmentierungsstudien mittels kollisionsinduziertem Zerfalls (engl. collisionally induced decay, CID) in der linearen Ionenfalle des LTQ-FT-Massenspektrometers durchgeführt. Bei der Analyse von Extrakten erfolgte die Fragmentierung online während der HPLC-MS-Analyse. Im Fall von gereinigten Proben wurde das Peptid mit Hilfe einer Spritzenpumpe mit einer Flussrate von 10 µL/min appliziert. In der Regel wurden die zweifach protonierten Ionen für die Fragmentierungsanalyse selektiert, da sie die dominierende Spezies im Spektrum repräsentierten. Als Normalisierte Kollisionsenergie wurde für alle Experimente 35 verwendet.

3.4.4 Peptidmassen-Fingerabdruck

Die Identität der heterolog exprimierten Proteine wurde im Anschluss an die Expression und SDS-PAGE-Analytik mit Hilfe des Peptidmassen-Fingerabdrucks (engl. peptide mass fingerprinting, PMF) untersucht. Dazu wurden die Gelbanden, die dem berechneten Molekulargewicht entsprachen, ausgeschnitten und in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß transferiert. Es wurden 200 µL Waschlösung (200 mM NH₄HCO₃, 50% (v/v) CH₃CN) zugegeben, bei 37 °C 30 min inkubiert und anschließend mittels einer Vakuumzentrifuge wieder entfernt (37 °C, 30 min). Der tryptische Verdau des Proteins innerhalb der Gelbande (engl. in-gel tryptic digestion) wurde durch Zugabe von 20 µL Trypsin-Lösung (0.02 µg/µL Trypsin, 10% NH₄HCO₃, 10% (v/v) CH₃CN, pH 8.1) durchgeführt. Nach einer ersten Inkubation bei 37 °C für 45 min wurde die überschüssige Trypsin-Lösung entfernt und für weitere 16 h inkubiert. Durch Zugabe von 25 µL Diffusionslösung (1% (v/v) TFA, 10% (v/v) CH₃CN, pH 8.1) wurden die Peptidfragmente unter Ultraschallbehandlung (45 min, RT) aus der Gelbande eluiert. Die anschließende Analyse erfolgte unter Verwendung eines Nano-Spray-HPLC-QTOF-MS-Systems und die Proteine wurden durch Vergleich des Peptidmassen-Fingerabdrucks mit der MASCOT-Datenbank identifiziert.

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 Abspaltung von Fusionsproteinen durch die TEV-Protease

Die MBP- und NusA-Fusionsproteine von CapB und CapC enthalten eine ENLYFQG-Sequenz im Linkerbereich zwischen dem Fusionsprotein und dem Zielprotein, die von der TEV-Protease (engl. tobacco etch virus) erkannt und zwischen Gln und Gly gespalten wird. Die Abspaltung der Fusionsproteine mit Hilfe der TEV-Protease wurde generell in 20 mM TRIS/HCl, 1 mM DTT, pH 8.0 über Nacht bei 4 °C unter Einsatz von 0.1 – 0.2 Äquivalenten TEV-Protease durchgeführt. Nach der Spaltung wurden die TEV-Protease und das abgespaltene Fusionsprotein, die beide über einen His(6)-Tag verfügen, mittels einer Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (siehe Abschnitt 3.2.2.2) vom Zielprotein abgetrennt.

3.5.2 *In vitro* Rekonstitution der Biosynthese von Capistruin

Mit Hilfe der heterolog exprimierten und gereinigten Einzelkomponenten CapA, CapB und CapC wurde versucht, die Biosynthese von Capistruin *in vitro* zu rekonstituieren. Dazu wurden 1 – 50 μM CapA in Gegenwart von 0.1 – 10 μM CapB und CapC (jeweils als NusA- oder MBP-Fusion) in 50 mM Na_2HPO_4 , pH 8.0, 1 mM DTT, 1 mM ATP und 1 mM MgCl_2 bei 25 °C, 37 °C oder 42 °C inkubiert. Das Gesamtvolumen der Assays wurde zwischen 50 μL und 1 mL variiert. Als Kontrolle dienten Assays ohne die beiden prozessierenden Enzyme. Zur Analyse des Einflusses der Pufferbedingungen wurden pH-Werte zwischen 7.0 und 9.0 untersucht, sowie die NaCl-Konzentration zwischen 0 und 500 mM variiert. Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte photometrisch unter Verwendung der in Tabelle 3.3 dargestellten berechneten Extinktionskoeffizienten [161]. Die Assays wurden durch eine Hitzedenaturierung der Enzyme durch zehnminütige Inkubation bei 95 °C abgestoppt, zentrifugiert (13000 rpm, 15 min, RT) und anschließend mittels HPLC-MS analysiert.

Tabelle 3.3: Berechnete Extinktionskoeffizienten der Reifungsenzyme [161].

Protein	N-terminale Fusion	ϵ_{280} in $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
CapB	MBP	109780
	NusA	74370
CapC	MBP	131210
	NusA	95800

3.5.3 Carboxypeptidase-Verdau von Lassozeptiden

Die Lassoptide Capistruin, BI-32169 und Anantin wurden mittels Carboxypeptidase-Verdau auf ihre Lassostruktur hin untersucht. Die Verdau wurde in 50 mM MES, pH 6.75 unter Verwendung von 0.01 – 1 U Carboxypeptidase Y (Sigma-Aldrich) bei 25 °C durchgeführt. Es wurden 10 – 20 μg Peptid in einer 50 μL Reaktion eingesetzt und der proteolytische Verdau durch thermische Denaturierung bei 95 °C für 5 min nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (0 – 300 min) gestoppt. Anschließend wurden die Proben mittels HPLC-MS analysiert.

3.5.4 Thermische Stabilitätsstudien und Elastase-Verdau von Capistruinvarianten

Um die thermische Stabilität ausgewählter Capistruinvarianten zu untersuchen, wurden Hitzeexperimente in Kombination mit Elastase-Verdauen durchgeführt. Dazu wurden Extrakte des Überstands einer 6 L Kultur präpariert (siehe Abschnitt 3.3.2) und in 1.6 mL 20 mM TRIS/HCl, pH 8.0 gelöst. In einer 30 μL Reaktion wurden 25 μL des Extrakts in An- bzw. Abwesenheit von 0.025 U Elastase (Sigma-Aldrich) 1 h bei 25 °C inkubiert (20 mM TRIS/HCl, pH 8.0 wurde zum Auffüllen auf 30 μL verwendet). Anschließend wurden die Proben 1 - 3 h auf 95 °C erhitzt, auf 25 °C abgekühlt und nochmals in An- bzw. Abwesenheit von zusätzlichen 0.025 U Elastase für 1 h bei 25 °C inkubiert. Nach jedem einzelnen Inkubationsschritt wurden 20 μL der Reaktionslösungen mittels HPLC-MS analysiert.

3.5.5 Reduktion und Reoxidation von BI-32169

Um BI-32169 in der reduzierten Form massenspektrometrisch untersuchen zu können, wurde 1 mg des Peptids in 1 mL 50 mM Na₂HPO₄, 6 M GdmCl, pH 8.0 gelöst und in einer 100 µL Reaktion in Gegenwart von 20 mM DTT 30 min bei 25 °C reduziert. Zur Reoxidation des reduzierten BI-32169 wurde das Peptid für 72 h bei 25 °C Luftsauerstoff ausgesetzt. Anschließend wurden jeweils 20 µL mittels HPLC-MS analysiert.

3.5.6 Untersuchungen zur antibakteriellen Aktivität von Capistruin

Die Bioaktivitätsstudien von Capistruin wurden in Kooperation mit Prof. Sylvie Rebuffat (Paris) und Prof. John Govan (Edinburgh) durchgeführt. Die antibakterielle Aktivität des Peptids wurde anhand von radialen Diffusionsassays gegenüber den folgenden Stämmen bestimmt: *Burkholderia anthina* J2552, *B. caledonica* (DSM 17062^T), *B. caribensis* (DSM 13236^T), *B. cepacia* (ATCC 25416^T), *B. cepacia* (ATCC 17759), *B. dolosa* CEP021, *B. multivorans* C5393, *B. multivorans* JTC, *B. pyrrocinia* BC011, *B. ubonensis* (DSM 17311^T), *B. vietnamiensis* (LMG 10929^T), *B. vietnamiensis* PC 259, *Pseudomonas aeruginosa* AT27853, *P. azotoformans* (DSM 18862^T), *P. cremoricolorata* (DSM 17059^T), *P. oryzihabitans* (DSM 6835^T), *P. fulva* (DSM 17717^T), *P. parafulva* (DSM 17004^T), *P. straminea* (DSM 17727^T), *E. coli* K12 MC4100, *E. coli* 363, *E. coli* W3110, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* Enteritidis, *S. enterica* Paratyphi SL69, *S. enterica* Thyphimurium LT2, *Enterobacter cloacae*, *Erwinia carotovora*, *Aerococcus viridans*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus*.

Zur Herstellung der Zweischicht-Agarplatten wurden 10 mL M63- oder TSB-Softagarmedium (6.5 g/L Agar Nr.1) mit 100 – 250 µL (10⁷ cfu/mL) einer Bakterienkultur in der exponentiellen Wachstumsphase inokuliert. Anschließend wurde eine abgekühlte 20 mL LB- oder TSB-Agarschicht (15 g/L Agar Nr. 1) in einer Petrischale mit der Bakteriensuspension überschichtet. Nach dem Aushärten der Softagarschicht wurden 1 nmol MccJ25 und 5 nmol Capistruin auf die Agaroberfläche gegeben und 16 – 24 h bei 25, 30 oder 37 °C inkubiert (in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen des jeweiligen Stamms). Im Anschluss wurden die Zweischicht-Agarplatten nach Hemmhöfen untersucht.

Sofern Hemmhöfe zu beobachten waren, wurde die minimale inhibitorische Konzentration (engl. minimal inhibitory concentration, MIC) mit Hilfe von Wachstumsinhibitionsassays in sterilen 96er Mikrotiterplatten unter Verwendung von PB als Wachstumsmedium bestimmt. Durch wiederholtes zweifaches Verdünnen mit sterilem ddH₂O wurde eine Verdünnungsreihe des Peptids über einen Konzentrationsbereich von 0.5 bis 1000 µM generiert. 10 µL dieser Peptidlösungen wurden zu 90 µL der Bakterienkultur gegeben, die mittels PB-Puffer auf eine OD₆₀₀ von 0.002 – 0.005 verdünnt worden war. Jede Peptidkonzentration wurde in Triplikaten untersucht. Als Referenz zur Bestimmung der optischen Dichten diente die Peptidlösung in PB-Puffer. Nach Inkubation der Mikrotiterplatten bei 30 °C für 14 h (37 °C im Falle von *E. coli* 363) wurde die optische Dichte der Kulturen bei 595 nm bestimmt und um die Referenz korrigiert. Die niedrigste Konzentration von Capistruin, die zu einer vollständigen Inhibition des Wachstums führte, wurde als MIC definiert.

3.5.7 Bindungsstudien von MccJ25 RGD an $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ Integrine

Die Fähigkeit von MccJ25 RGD, an $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ Integrine zu binden, wurde durch die *in vitro* Inhibition der Integrin-Vitronectin-Bindung mittels eines enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (engl. enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) analysiert. Die Versuche wurden in Kooperation mit Prof. Horst Kessler (Technische Universität München) durchgeführt und erfolgten in Anlehnung an publizierte Protokolle [162].

Zur Bestimmung der Affinität von MccJ25 RGD zu $\alpha_v\beta_3$ bzw. $\alpha_v\beta_5$ Integrinen wurden 96-well ELISA-Platten (Brand) mit 100 μL /well 0.4 $\mu\text{g/mL}$ humanem $\alpha_v\beta_3$ bzw. 1.0 $\mu\text{g/mL}$ humanem $\alpha_v\beta_5$ (Chemicon) in TS-Puffer (20 mM TRIS/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 1 mM MnCl_2 , pH 7.5) über Nacht ge-coated. Nach Entfernen der Lösung wurden die Vertiefungen mit jeweils 150 μL 1% BSA in TS-Puffer geblockt. Anschließend wurden die Platten mit 300 μL /well PBST-Puffer (10 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 0.01% Tween 20, pH 7.5) gewaschen. Die Testverbindung und Cilengitid (Orpegen Pharma) als interne Kontrolle (0.0003 – 10 μM) wurden jeweils mit 1 $\mu\text{g/mL}$ humanem Vitronectin (Chemicon) gemischt, das zuvor mit Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Pierce, molares Verhältnis 20:1) biotinyliert worden war. Es wurden 100 μL /well dieser Lösungen zugegeben und 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde fünfmal mit 300 μL /well PBST-Puffer gewaschen. Danach wurden 100 μL /well 0.25 $\mu\text{g/mL}$ Neutravidin-Meerrettichperoxidase (Pierce) in TSB-Puffer zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem fünfmaligen Waschen mit PBST-Puffer wurde die ELISA-Platte durch Zugabe von 100 μL /well 1 mg o-Phenylendiaminhydrochlorid in 2.5 mL 0.012% aq. H_2O_2 , 24 mM Natriumcitrat, 50 mM Na_2HPO_4 , pH 5.0 (hergestellt durch Lösen von Substrattabletten (Sigma) in Puffer) entwickelt. Nach 15 min wurde die Reaktion mit 50 μL /well 2 M H_2SO_4 gestoppt und die Absorption bei 492 nm mit Hilfe eines POLARstar Galaxy Plattenlesegeräts (BMG Labtechnologies) ausgelesen. Die Ergebnisse wurden durch Mittelwertbildung aus zwei Messreihen bestehend aus jeweils 11 Konzentrationen bestimmt. Als Referenz dienen die Pufferkontrollen, in denen die Testverbindung fehlte. Die Halbmaximalen-Inhibitionskonzentrationen (IC_{50}) wurden mit Hilfe eines sigmoidalen Fits in OriginPro 7.5G bestimmt. Als interne Kontrolle wurden pro Platte jeweils zwei Messreihen mit Cilengitid ($\alpha_v\beta_3$: IC_{50} = 0.58 nM [163]; $\alpha_v\beta_5$: IC_{50} = 37 nM [164]) aufgenommen.

3.5.8 Angiogenesetests von MccJ25 RGD

Die Angiogenesetests von MccJ25 RGD wurden in Kooperation mit Dr. Florenz Sasse (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) durchgeführt. Dazu wurden die Vertiefungen einer 96-well-Platte mit Matrigel (Becton Dickinson) beschichtet und darin die Gefäßbildung durch humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) beobachtet. Gefrorenes Matrigel wurde bei 4 °C über Nacht aufgetaut und 1:1 mit kaltem Zellkulturmedium EBM-2 (LONZA) verdünnt. Davon wurden 35 μL mit gekühlten Pipettenspitzen in die Vertiefungen einer auf Eis gekühlten Mikrotiterplatte gegeben. Zum Auspolymerisieren wurde die Platte für 30 min bei 37 °C inkubiert und danach mit HUVEC (LONZA; 800000 Zellen/mL; 25 μL /Vertiefung) beimpft. Zusätzlich wurden 25 μL der

Probenlösungen zugegeben, die durch serielle Verdünnung in einer gesonderten Mikrotiterplatte hergestellt worden waren.

Die beimpften Zellkulturplatten wurden in einem Inkubator bei 37 °C und 10% CO₂ gehalten. Am nächsten Tag wurde die Angiogenese visuell mit Hilfe eines inversen Mikroskops bei geringer Vergrößerung (5x Objektiv) beurteilt und mittels einer angeschlossenen CCD-Kamera dokumentiert. Als Kontrolle dienten Vertiefungen mit dem Lösemittel, als Standardhemmer wurde Suramin eingesetzt.

3.5.9 Proliferationshemmtests

Die Proliferationshemmtests wurden ebenfalls in Zusammenarbeit mit Dr. Florenz Sasse (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) durchgeführt. Um allgemeine cytotoxische und wachstumshemmende Eigenschaften zu bestimmen, wurden Tests mit Mausfibroblasten der Zelllinie L929 (ACC2, DSMZ) und HUVEC (primäre humane Endothelzellen der Nabelschnurvene; LONZA) verwendet. L929 wurde in DME-Medium (GIBCO) mit hohem Glukoseanteil und Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum gehalten, HUVEC in EBM-2 (LONZA). Beide Zelllinien wurden bei 37 °C und 10 % CO₂ kultiviert.

Der Test wurde in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen durchgeführt. In die Vertiefungen wurden 120 µL suspendierte Zellen (50 000/mL) und 60 µL der seriellen Verdünnungen der Wirkstofflösung in DME-Medium pipettiert. Die Auswertung erfolgte über einen MTT-Test nach 5 Tagen Inkubation. Der MTT-Test nutzt die Umwandlung des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan durch intakte Zellen aus. Dazu wurden 20 µL MTT-Lösung (5 mg/mL in PBS) jeder Vertiefung zugesetzt und 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach dem Zentrifugieren der Platte (3000 rpm, 5 min) wurde der Überstand ausgeschlagen, mit je 100 µL PBS gewaschen und das Formazan durch Zusatz von 100 µL Propan-2-ol/HCl (100 mL Propan-2-ol und 400 µL konz. HCl) mit Hilfe eines Plattenschüttlers gelöst. Nach 10 min wurde die Absorption bei 590 nm gemessen. Werte für die mit den Substanzen behandelten Zellen wurden auf Werte der Kontrollzellen bezogen, die nur mit dem Lösemittel inkubiert worden waren. Aus den sigmoiden Hemmkurven wurde ein IC₅₀-Wert ermittelt.

3.6 Spektroskopische Methoden

3.6.1 CD-Spektroskopie

Um den Einfluss der Polarität der Umgebung auf die Sekundärstruktur des Capistruinvorläuferproteins CapA zu untersuchen, wurden Fern-UV-CD-Spektren von 0.3 mg/mL CapA in 10 mM Natriumphosphat, pH 7.4 in An- und Abwesenheit von 8 mM SDS aufgenommen. Die Messungen wurden mit einem Jasco J-810 Spektropolarimeter in 1 mm Quarzküvetten bei 25 °C in einem Wellenlängenbereich von 250 bis 190 nm durchgeführt. Die Scangeschwindigkeit betrug 20 nm/min, die Auflösung 0.2 s, die Dämpfung 2 s und die Bandbreite 1 nm. Es wurden 10 Spektren

akkumuliert und gemittelt. Die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure ($[\Theta]_{\text{MRW}}$) wurde aus der gemessenen Elliptizität (Θ) anhand der folgenden Gleichung berechnet:

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\Theta}{c \cdot d \cdot N_{\text{AS}} \cdot 10} \left[\frac{\text{deg} \cdot \text{cm}^2}{\text{dmol}} \right]$$

$[\Theta]_{\text{MRW}}$	mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure in $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$
Θ	gemessene Elliptizität in mdeg
c	Proteinkonzentration in M
d	Schichtdicke der Küvette in cm
N_{AS}	Anzahl der Aminosäuren des Proteins

3.6.2 NMR-Spektroskopie und Strukturaufklärung

Die NMR-spektroskopische Untersuchung und Strukturaufklärung der Lassoptide Capistruin und BI-32169 wurde in Kooperation mit Dr. Xiulan Xie (Leiterin der NMR-Abteilung des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg) durchgeführt. Alle Messungen erfolgten an einem Bruker Avance 600 MHz Spektrometer mit einem BBI-(Inversbreitband-)Probenkopf mit Gradient in der z-Achse. Die Probe wurde jeweils in Wilmad 3 mm NMR-Röhrchen (Rototec Spintec) gefüllt.

3.6.2.1 Capistruin

Zur Strukturaufklärung von Capistruin wurden 4.4 mg des Peptids in 250 μL $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, v/v) gelöst. Der Einfluss der Temperatur auf die chemischen Verschiebungen wurde durch Aufnahme von ^1H -Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen (283 K, 288 K, 293 K, 298 K, 300 K) untersucht. Für alle weiteren Experimente wurde eine Temperatur von 283 K gewählt. Zur sequentiellen Zuordnung [165] wurden DQF-COSY-, TOCSY-, NOESY-, ROESY- und ECOSY-Experimente [166] mit phasensensitiver Datenaufnahme unter Verwendung der States-TPPI-Technik [167] durchgeführt. TOCSY-Spektren wurden mit einer Mischzeit von 50 und 80 ms, NOESY-Spektren mit 70, 100, 150 und 300 ms und ROESY-Spektren mit 200 ms aufgenommen. Zusätzlich wurden ^1H - und COSY-Spektren in D_2O bei 283 K in Zeitintervallen von 2 h, 1 d und 10 d nach Probenvorbereitung gemessen. Die Unterdrückung des Wassersignals erfolgte mit Hilfe von Excitation Sculpting [168] unter Verwendung von Gradienten für die DQF-COSY-, TOCSY-, NOESY- und ROESY-Experimente, währenddessen Vorsättigung für die ECOSY-Experimente eingesetzt wurde. Eindimensionale Spektren wurden mit 65536 Datenpunkten aufgenommen, während zweidimensionale Spektren mit 4096 Datenpunkten und 512 Experimenten aufgezeichnet wurden. Für 2D-Spektren wurden 32 Transienten (mit Ausnahme von 72 für ECOSY-Spektren) verwendet und der Relaxationsdelay war 2.5 s. Die chemische Verschiebung ist in Bezug auf Tetramethylsilan (TMS) als Standard in ppm angegeben. Zur Referenzierung wurde H_2O verwendet, dessen Signal mit Hilfe von 2,2-Dimethyl-2-silapentanon-5-sulfonat (DSS) als internem Standard kalibriert wurde. Alle Spektren wurden mit Hilfe von Bruker TOPSPIN 2.1 prozessiert und NOESY-Spektren wurden in Sparky [169] analysiert.

Die Kreuzsignale der NOESY-Spektren mit Mischzeiten von 70 und 100 ms wurden integriert, kalibriert und die Distanzbeschränkungen mittels Sparky bestimmt. Die Torsionswinkel ϕ wurden mit Hilfe der gemessenen $^3J_{\text{HH}\alpha}$ und den Karplus-Gleichungen [170] ermittelt. Die stereospezifische Zuordnung der β -Methylenprotonen erfolgte auf Basis der $^3J_{\alpha\beta}$ -Kopplungskonstanten, die mit Hilfe des ECOSY-Experiments in D₂O und der Stärke der NOEs zwischen den NH und β Hs bestimmt wurden [171]. Die ermittelten Beschränkungen wurden im Simulated-Annealing-Protokoll verwendet und die Strukturberechnung mit Hilfe des Programms CYANA 2.1 [172] durchgeführt. Die Koordinaten von 15 Niedrigenergie-Strukturen, die die Struktur von Capistruin in Lösung repräsentieren, wurden bei der Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB) unter der Zugangsnummer 20014 hinterlegt.

3.6.2.2 BI-32169

Zur Aufklärung der NMR-Struktur von BI-32169 wurden 5 mg des nativen Peptids in 250 μ L DMSO- d_6 gelöst. Alle Experimente wurden bei 313 K durchgeführt. Zur sequentiellen Zuordnung [165] wurden DQF-COSY-, TOCSY-, NOESY- und ROESY-Experimente [166] mit phasensensitiver Datenaufnahme unter Verwendung der States-TPPI-Technik [167] durchgeführt. TOCSY-Spektren wurden mit einer Mischzeit von 50 und 80 ms, NOESY-Spektren mit 70, 100, 150 und 300 ms und ROESY-Spektren mit 200 ms aufgenommen. Die Unterdrückung des Wassersignals erfolgte mit Hilfe von Excitation Sculpting [168]. Eindimensionale Spektren wurden mit 65536 Datenpunkten aufgenommen, während zweidimensionale Spektren mit 4096 Datenpunkten und 512 Experimenten aufgezeichnet wurden. Für 2D-Spektren wurden 32 Transienten (mit Ausnahme von 72 für ECOSY-Spektren) verwendet und der Relaxationsdelay war 2.5 s. Zur Referenzierung der chemischen Verschiebung wurde das Restsignal des deuterierten Lösungsmittels eingesetzt. Alle Spektren wurden mit Hilfe von Bruker TOPSPIN 2.1 prozessiert. NOESY-Spektren mit Mischzeiten von 70 und 100 ms wurden in Sparky [169] analysiert und die Distanzbeschränkungen mit Hilfe des Programms CYANA 2.1 [172] bestimmt. Für die Strukturberechnung wurden die aus dem 100 ms Mischzeit-Experiment abgeleiteten Distanzbeschränkungen verwendet. Die Bestimmung der Torsionswinkel ϕ und die stereospezifische Zuordnung der β -Methylenprotonen erfolgte wie in Abschnitt 3.6.2.1 für Capistruin beschrieben.

Die abgeleiteten Beschränkungen wurden im Simulated-Annealing-Protokoll verwendet und die Strukturberechnung mit Hilfe des Programms CYANA 2.1 [172] durchgeführt. Die berechneten Strukturen wurden mittels Sybyl 7.3 bearbeitet, um die intramolekulare Isopeptidbindung einzuführen. Im Anschluss wurde eine Energieminimierung unter Berücksichtigung der NMR-Beschränkungen und unter Verwendung des TRIPOS-Force-Field in Sybyl durchgeführt. Die Qualität der 15 Strukturen mit niedrigster Energie wurde mit Hilfe von PROCHECK-NMR [173] evaluiert und die Koordinaten dieser Strukturen, die die Struktur von BI-32169 in Lösung repräsentieren, wurden bei der Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB) unter der Zugangsnummer 20105 hinterlegt.

4. Ergebnisse

4.1 Capistruin – ein Lassozeptid aus *Burkholderia thailandensis* E264

4.1.1 Identifizierung eines Lassozeptidbiosyntheseclusters in *Burkholderia thailandensis* E264 durch Genomisches Mining

Bei der Biosynthese von Microcin J25 sind die beiden prozessierenden Enzyme McjB und McjC in der Lage, das ribosomal synthetisierte Vorläuferprotein McjA in das bioaktive Lassozeptid zu überführen [128,131]. McjC ist dabei aufgrund seiner Homologie zu Asparagin Synthetasen B und β -Laktamsynthetasen vermutlich für die Adenylierung der Seitenkettencarboxylgruppe des Glu8 verantwortlich, also für die Aktivierung des Elektrophils der Zyklisierungsreaktion. Dagegen zeigt McjB kaum Homologien zu bekannten Proteinen, am ehesten zu bakteriellen Transglutaminasen, die zumeist als Proteasen fungieren [133]. Diese Homologie impliziert, dass McjB für die proteolytische Abspaltung des Leaderpeptids verantwortlich ist. Aufgrund der geringen Homologie zu bekannten Proteinen wurde McjB als Ausgangspunkt für die Entwicklung eines rationalen, auf Genomischem Mining basierenden Ansatzes zur Identifizierung neuer Lassozeptide ausgewählt (Abbildung 4.1).

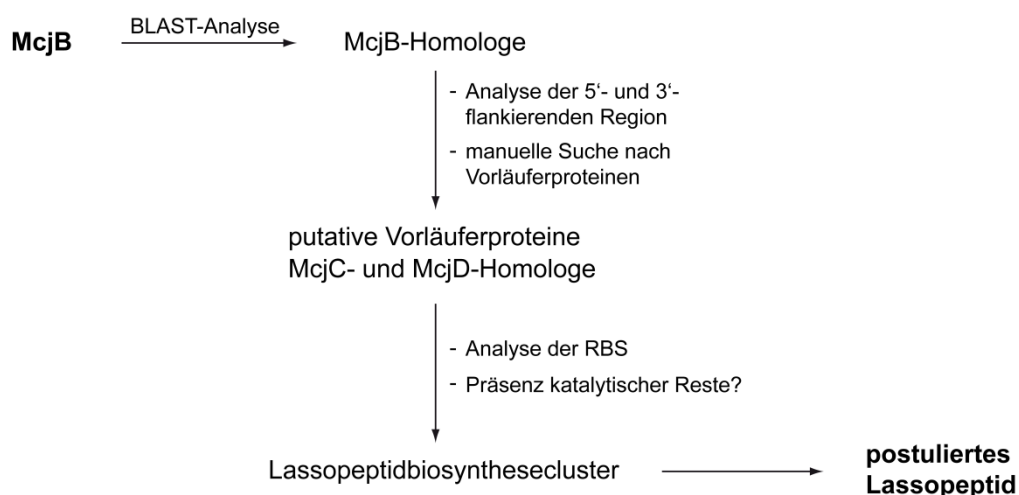


Abbildung 4.1: Strategie zur Identifizierung putativer Lassozeptidbiosynthesecluster in Bakterien auf der Basis von Genomischem Mining.

Dabei wird davon ausgegangen, dass zu McjB homologe, unbekannte Proteine Bestandteil von Lassozeptidbiosyntheseclustern in Bakterien sein können. Folglich würde eine nähere Analyse dieser Homologen und der flankierenden Bereiche des kodierenden Gens auf dem Chromosom die Vorhersage neuer Gencluster und damit bisher unbekannter lassostrukturierter Peptide ermöglichen. Genomisches Mining könnte somit die gezielte Isolierung neuer Vertreter dieser strukturell einzigartigen Naturstoffe erlauben. Um das Potential dieser Strategie zu evaluieren, wurde zunächst eine BLAST-Analyse durchgeführt, bei der nach Homologen von McjB in der nr-Datenbank (non-redundant protein sequences, nr) mittels des BlastP-Algorithmus gesucht wurde [174]. Unter

den ersten 15 Treffern mit signifikanten Alignments waren 13 *Burkholderia*-Stämme vertreten, neben den pathogenen Stämmen *B. mallei* und *B. pseudomallei* auch der nichtpathogene Stamm *Burkholderia thailandensis* E264. Bei der Analyse des Chromosoms I von *Burkholderia thailandensis* E264 (GenBank: CP000086) in der 3'-flankierenden Region des Gens, das für das McjB-homologe Protein kodiert, wurden bereits annotierte Homologe von McjC und dem Exportprotein McjD lokalisiert. Durch manuelle Suche im 5'-flankierenden Bereich konnte darüber hinaus ein bisher noch nicht annotiertes 144 bp ORF (open reading frame) identifiziert werden, das für ein putatives Lassozeptidvorläuferprotein kodiert (Abbildung 4.2).

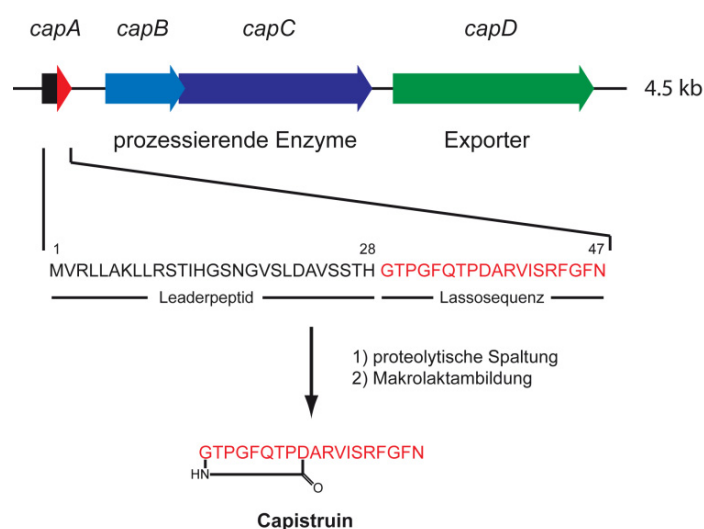


Abbildung 4.2: Durch Genomisches Mining identifiziertes, putatives Biosynthesecluster von Capistruin. Das putative Lassozeptid Capistruin setzt sich aus den 19 C-terminalen Aminosäuren des Vorläuferproteins CapA zusammen. Die Gene, die an der Reifung (*capB* und *capC*) und dem Export (*capD*) des Lassozeptids beteiligt sind, befinden sich in der 3'-flankierenden Region des Vorläufergens *capA* auf dem Chromosom I von *Burkholderia thailandensis* E264.

Dieser putative ribosomale Vorläufer setzt sich aus 47 Aminosäuren zusammen, von denen die ersten 28 AS vermutlich das Leaderpeptid repräsentieren und die C-terminalen 19 AS im gereiften Lassozeptid zu finden sind. Diese sogenannte Lassosequenz besitzt ein Glycin an Position 1 und ein Aspartat an Position 9, die nach einer Kondensationsreaktion den für Lassoptide typischen Makrolaktamring bilden können. Als sterisch anspruchsvolle Seitenreste zur Fixierung des C-Terminus innerhalb des N-terminalen Makrozyklus kommen Arg15, Phe16 oder Phe18 in Frage. Damit erfüllt das identifizierte 47-AS Protein alle Kriterien, die nach bisherigen Erkenntnissen an ein Lassozeptidvorläuferprotein zu stellen sind. Sequenzalignments der gefundenen Homologen mit den Reifungs- und Exportproteinen des MccJ25-Biosyntheseclusters zeigten, dass alle für die jeweilige Funktion der Proteine als essentiell angenommenen Aminosäureseitenketten in den identifizierten Proteinen konserviert sind. Folglich wurde das durch Genomisches Mining identifizierte Lassozeptidbiosynthesecluster als theoretisch funktional eingestuft und das zu isolierende putative Lassozeptid aus *Burkholderia thailandensis* E264 Capistruin (lat. capistrum, Schlinge) genannt. In Analogie zur Nomenklatur des MccJ25-Biosyntheseclusters wurden die Gene mit *capA*, *capB*, *capC*

und *capD* bezeichnet. Die Eigenschaften der Genprodukte dieser kodierenden Sequenzen des Capistruinbiosynthesecusters sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Übersicht der Genprodukte des Biosynthesegenclusters von Capistruin.

Protein	N _{AS}	Postulierte Funktion	Homologie	Globale Identität/ Ähnlichkeit	GenBank Zugangsnummer
CapA	47	Capistruin- vorläuferprotein	-	-	-
CapB	221	Protease	McjB	23%/36%	YP_442959.1
CapC	582	Adenylierung, Zyklisierung	McjC	15%/38%	YP_442960.1
CapD	606	Exporter, Immunitätsprotein	McjD	19%/44%	YP_442961.1

Um zu untersuchen, ob das postulierte Lassozeptid Capistruin von *Burkholderia thailandensis* E264 produziert wird, wurde der Stamm in M9-Minimalmedium (8 mg/mL Gentamycin, 0.2% Arabinose) bei 37 °C für 24, 48 und 72 h fermentiert. Das Minimalmedium wurde gewählt, da für Microcin J25 die höchste Produktion in Minimalmedium beobachtet wurde [111,156]. Anschließend wurde der Kulturüberstand extrahiert und die Extrakte mittels HPLC-FT-ICR-MS hinsichtlich der Masse von Capistruin analysiert, die aufgrund der postulierten Primärstruktur des Lassozeptids berechnet werden konnte. Im Extrakt des Kulturüberstands nach 24-stündiger Fermentation wurde eine zweifach geladene Verbindung mit einer Retentionszeit von 19.71 min detektiert (Abbildung 4.3), die das m/z -Verhältnis des vorhergesagten Naturstoffs zeigte ($[M + 2H]^{2+}_{\text{berechnet}} = 1025.0191$; $[M + 2H]^{2+}_{\text{beobachtet}} = 1025.0206$; Abweichung 1.4 ppm). Nach 48- bzw. 72-stündiger Fermentation war diese Verbindung nicht nachweisbar.

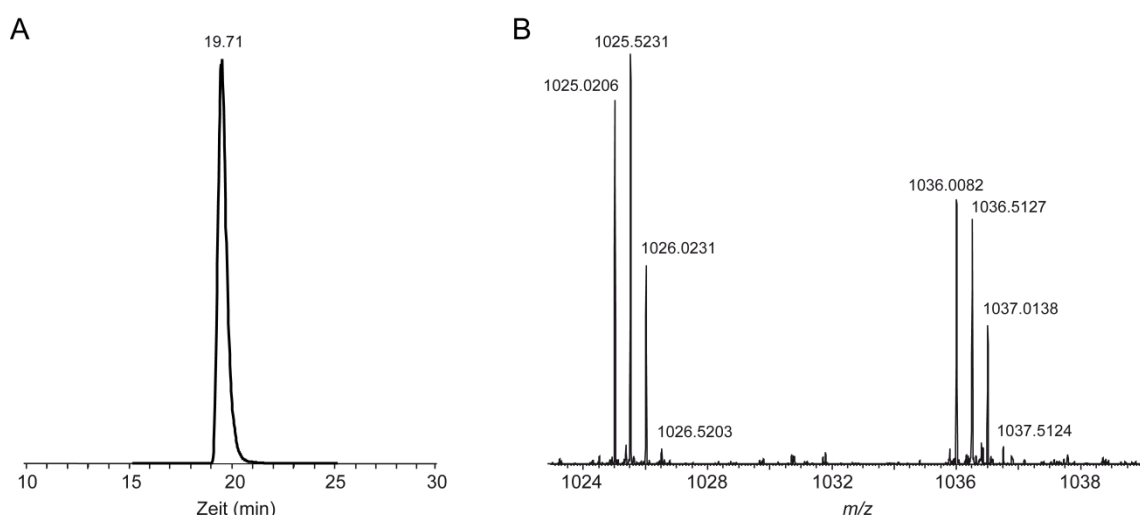


Abbildung 4.3: HPLC-MS-Analyse des extrahierten Kulturüberstands von *B. thailandensis* E264. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm (m/z 1025.0 – 1025.1) des Kulturüberstandsextrakts von *B. thailandensis* E264 kultiviert in M9-Medium bei 37 °C für 24 h. (B) ESI-FT-MS-Spektrum von Capistruin (t_R : 19.71 min). $[M + 2H]^{2+}_{\text{berechnet}} = 1025.0191$; $[M + 2H]^{2+}_{\text{beobachtet}} = 1025.0206$; Abweichung 1.4 ppm. Das Signal bei m/z 1036 entspricht einem Natriumaddukt.

4.1.2 Massenspektrometrische Analyse von Capistruin

Um zu untersuchen, ob es sich bei der identifizierten Verbindung um ein Peptid handelt und ob dieses Peptid eine zyklische, verzweigt zyklische oder die postulierte Lassostruktur besitzt, die sich untereinander lediglich in ihrer Primärstruktur bzw. Topologie, aber nicht in ihrer Masse unterscheiden (und somit alle in der für Capistruin berechneten Masse übereinstimmen), wurden MSⁿ-Experimente mittels eines LTQ-FT-ICR-Massenspektrometers durchgeführt. Im Allgemeinen zeigen zyklische Peptide keine starke Fragmentierung in MSⁿ-Experimenten, da zur Generierung linearer Fragmente zwei Peptidbindungen brechen müssen, was statistisch weniger wahrscheinlich ist. Bei verzweigt zyklischen Peptiden, wie z. B. Daptomycin aus *Streptomyces roseosporus* (Uwe Linne, unveröffentlichte Ergebnisse) oder synthetischem MccJ25 [122], gibt in der Regel der lineare, exozyklische Teil Fragmentionen in hoher Ausbeute, wohingegen der zyklische Teil aus den oben genannten Gründen schlecht fragmentiert. Lasso-peptide wie MccJ25 sind von ihrer Primärstruktur her verzweigt zyklische Peptide. Aber aufgrund des durch den N-terminalen Makrolaktamring hindurch gefädelten C-Terminus zeigt MccJ25 ein einzigartiges Fragmentierungsverhalten, da binäre Peptidkomplexe als Tochterionen beobachtet werden, bei denen C-terminale Fragmente nicht-kovalent im Makrozyklus gefangen sind [109]. Unter Berücksichtigung dieses unterschiedlichen Fragmentierungsverhaltens wurden Fragmentierungsstudien in der Gasphase der m/z 1025 zweifach protonierten Spezies durchgeführt. Dabei wurde ein insgesamt schwaches Fragmentierungsverhalten beobachtet (Abbildung 4.4A).

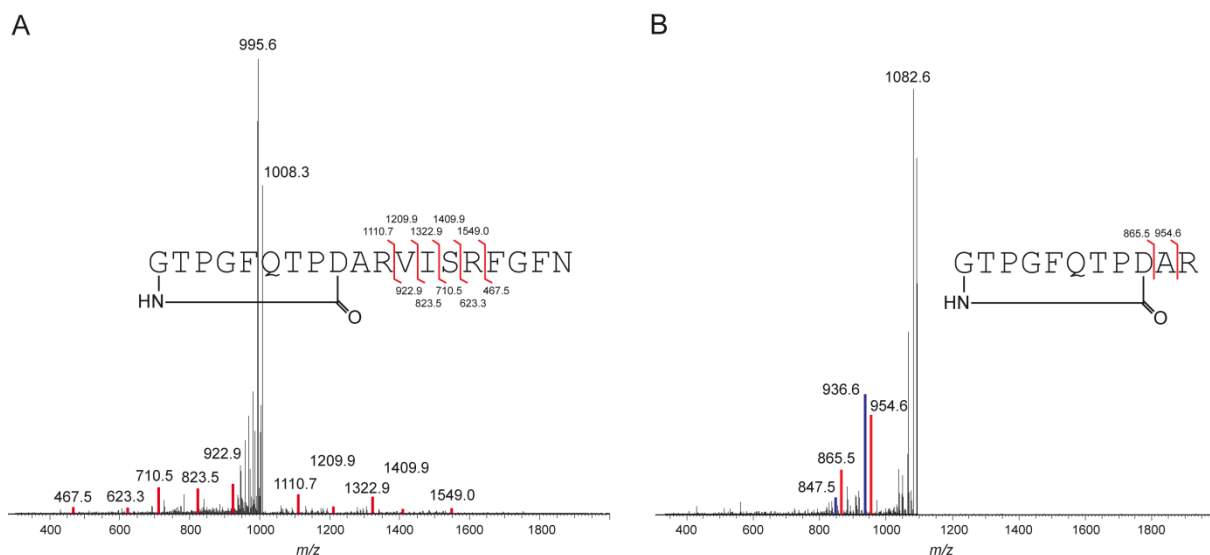


Abbildung 4.4: Fragmentierungsstudien von Capistruin. A) MS²-Spektrum der m/z 1025 doppelt protonierten Spezies. Die dominierenden Signale (m/z 995.6 und 1008.3) resultieren aus einem multiplen Verlust von Neutralkörpern (H_2O , CO oder NH_3). Die rot markierten Peaks entsprechen den schematisch dargestellten b- und y-Fragmentationen. B) MS³-Spektrum des m/z 1110.7 b_{11} -Tochterions ($[Capistruin_{1-11}]^+$). Die schematisch gezeigten Fragmente sind im Spektrum rot markiert. Die blau markierten Peaks (m/z 847.5 und 936.6) entsprechen diesen Fragmenten in Verbindung mit einem zusätzlichen Verlust eines H_2O -Moleküls (-18).

Die dominierenden Ionen resultierten aus dem Verlust von Neutalmolekülen, wie beispielsweise H_2O , CO oder NH_3 , was auf eine rigide und kompakte Struktur hindeutete. Die übrigen Fragmentionen niedriger Intensität gingen aus Peptidbindungsbrüchen des linearen C-terminalen Abschnitts hervor. Die Detektion dieser b- und y-Fragmentionen bestätigte sowohl, dass die identifizierte Verbindung Peptidcharakter besaß, als auch, dass sich das Peptid aus der postulierten Sequenz zusammensetzte. Außerdem konnte auf der Basis des MS^2 -Spektrums eine makrozyklische Struktur (*head-to-tail*) ausgeschlossen werden. Denn in diesem Fall würde man nicht nur eine Serie im C-terminalen Bereich des Peptids erwarten, sondern auch Peptidbindungsbrüche im N-terminalen Bereich, insbesondere der Bindungen N-terminal der beiden Proline, die als labilste Peptidbindungen in MS^n -Experimenten gelten [175]. Interessanterweise waren alle beobachteten Bindungsbrüche C-terminal von Arg11 lokalisiert. Da als Verzweigungspunkt für das Peptid chemisch nur Asp9 in Frage kommt, stellte sich die Frage, warum keine Fragmente durch Bindungsbrüche zwischen Asp9-Ala10 und Ala10-Arg11 gefunden wurden. Um zu überprüfen, ob die Peptidfragmente $[\text{Peptid}_{1-9}]^+$ und $[\text{Peptid}_{1-10}]^+$ in der Gasphase generiert werden können, wurde das b_{11} -Fragmention $[\text{GTPGFQTPDAR}]^+$ mit der Masse 1110.7 in einem MS^3 -Experiment weiter untersucht (Abbildung 4.4B). Dabei konnte der makrozyklische Ring (m/z 865.5) unter Abspaltung der C-terminalen Aminosäuren Arg11 und Ala10 detektiert werden. Eine weitere Fragmentierung des zyklischen Fragmentions in MS^4 -Experimenten war nicht zu beobachten.

Zusätzlich zu dem schwachen Fragmentierungsverhalten konnte das Peptid aus *Burkholderia thailandensis* E264 trotz der beiden Arginine im exozyklischen Teil (Arg11 und Arg15) nicht durch Trypsin gespalten werden. Weder eine Inkubation in Gegenwart von 1 M NaOH oder bei 100 °C führten zu einem veränderten Retentions- oder Fragmentierungsverhalten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass anhand der Fragmentierungsstudien dem Naturstoff zweifelsfrei die postulierte Aminosäuresequenz von Capistruin zugeordnet werden konnte. Sowohl das Fragmentierungsverhalten als auch die hohe Stabilität des Peptids gegenüber Trypsin lassen eine Lasso-topologie vermuten. Um die Lassostruktur eindeutig zu beweisen, waren NMR-spektroskopische Untersuchungen die Methode der Wahl. Voraussetzung dafür war eine Optimierung der Fermentationsbedingungen, um die benötigten Substanzmengen von 5 – 10 mg bereitstellen zu können.

4.1.3 Einfluss der Wachstumsbedingungen auf die Produktion von Capistruin

Im Allgemeinen ist die Produktion eines Naturstoffs abhängig von den gegebenen Wachstumsbedingungen, so dass ein Screening unterschiedlicher Bedingungen zu einer signifikanten Verbesserung der Produktionsmenge führen kann [12]. Um diesen Einfluss zu untersuchen, wurde *Burkholderia thailandensis* E264 in verschiedenen Medien und bei unterschiedlichen Temperaturen fermentiert. Nach definierten Zeitpunkten wurden die Kulturüberstände mit HPLC-MS analysiert und untereinander verglichen (Abbildung 4.5A). Dabei wurde bei der Kultivierung in M20-Medium bei 42 °C für 24 h eine 300-fache Zunahme der Peptidproduktion im Vergleich zu den ursprünglichen Kultivierungsbedingungen (M9-Medium, 0.2% Arabinose, 37 °C, 24 h) beobachtet. Das Minimalmedium M9 erwies sich unabhängig von der gewählten Kohlenstoffquelle (Glucose oder

Arabinose) und Temperatur (20, 25, 37 oder 42 °C) als ungünstiges Medium zur Produktion des Peptids, was in deutlichem Gegensatz zur MccJ25-Produktion stand [111,156]. Ferner ist die Produktion nicht wie im Falle von MccJ25 auf die frühe stationäre Phase limitiert [156], sondern erfolgt bereits in der exponentiellen Wachstumsphase (Abbildung 4.5B). In der stationären Phase wurde ein leichter Rückgang der rel. Peptidmenge im Kulturüberstand beobachtet, was auf einen Abbau der Verbindung bei längerer Fermentation hindeutete.

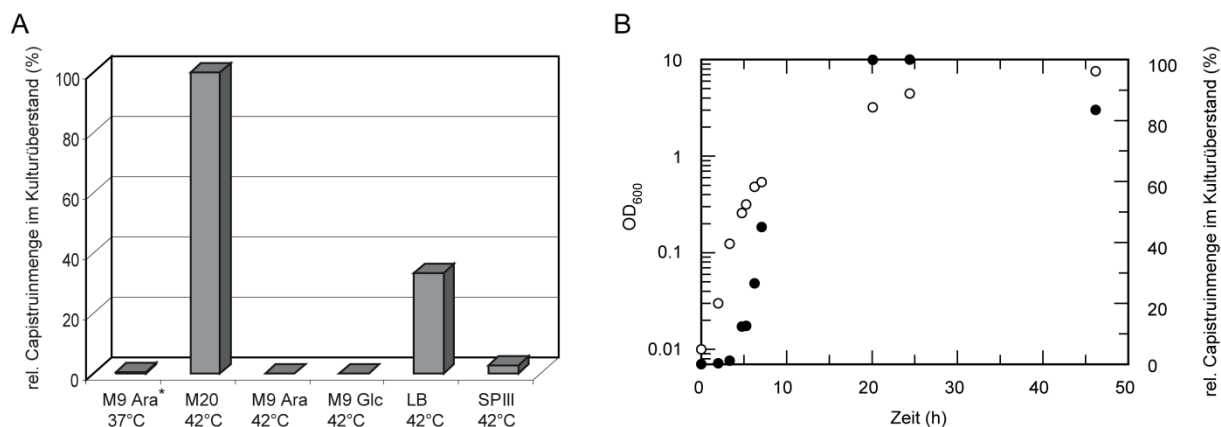


Abbildung 4.5: Einfluss der Wachstumsbedingungen und der -phase auf die Capistruinproduktion.

(A) Abhängigkeit der Capistruinproduktion von den Fermentationsbedingungen. Dargestellt ist die rel. Capistruinmenge im Kulturüberstand nach 24 h. Die zur ursprünglichen Identifizierung verwendete Bedingung ist mit einem Stern markiert. Die Kultivierung in M20-Medium bei 42 °C für 24 h führt im Vergleich dazu zu einer ~300-fachen Erhöhung der Peptidproduktion. (B) Einfluss der Wachstumsphase auf die Capistruinbiosynthese. Dargestellt ist die OD₆₀₀ einer Fermentation von *B. thailandensis* E264 in M20-Medium bei 42 °C (○) sowie die rel. Capistruinmenge im Kulturüberstand (●) zum jeweiligen Zeitpunkt. Die rel. Capistruinmenge im Kulturüberstand wurde mittels Peakintegration extrahierter Ionenchromatogramme bestimmt.

Unter Verwendung dieser Fermentationsbedingungen in Verbindung mit einem optimierten Extraktions- und Reinigungsprotokoll konnten 0.7 mg/L Kultur des Peptids aus dem Kulturüberstand von *B. thailandensis* E264 gereinigt werden (Abbildung 4.6).

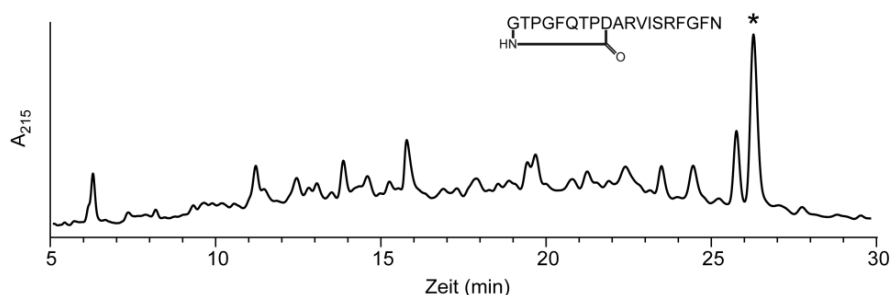


Abbildung 4.6: Reinigung von Capistruin aus dem Kulturüberstand. Gezeigt ist das Chromatogramm einer präparativen RP-HPLC-Reinigung von Capistruin aus dem XAD16-Extrakt des Kulturüberstands von *B. thailandensis* E264 kultiviert in M20-Medium bei 42 °C für 24 h. Der Naturstoff (*) zeigte eine Retentionszeit von 26.3 min und konnte mit einer Ausbeute von 0.7 mg/L Kultur isoliert werden.

Diese verbesserte Ausbeute bildete die Ausgangsbasis für die zur Strukturaufklärung notwendigen NMR-spektroskopischen Untersuchungen und erlaubte darüber hinaus eingehende Bioaktivitätsstudien des Naturstoffs.

4.1.4 NMR-spektroskopische Studien und Strukturaufklärung von Capistruin

Um die postulierte Lassostruktur zweifelsfrei zu beweisen, wurde das Peptid mittels NMR-Spektroskopie in Kooperation mit Dr. Xiulan Xie (Philipps-Universität Marburg) näher charakterisiert. Eine vollständige Zuordnung der ^1H -Signale wurde durchgeführt und innerhalb der Fingerprint-Region des DQF-COSY-Spektrums ein Kreuzpeak für jede Aminosäure mit Ausnahme von Pro3 und Pro8 beobachtet. Für diese beiden Prolinreste wurden in den NOESY-Spektren jeweils starke sequentielle Kreuzpeaks $\text{H}\alpha_i\text{-H}\delta_{i+1}$ detektiert, die eine trans-Konformation der beiden Peptidyl-Prolylbindungen beweisen. Die beobachteten starken Kern-Overhauser-Effekte (engl. nuclear overhauser effect, NOE) zwischen dem NH von Gly1 und den Seitenkettenprotonen von Asp9 bildeten einen direkten Beweis für die intramolekulare kovalente Verknüpfung der α -Aminogruppe von Gly1 mit der Seitenkettencarboxylgruppe von Asp9, die zur Bildung des Makrolaktamrings führt. Zusätzliche weitreichende NOE-Kontakte wurden zwischen NH von Thr2 und den Seitenkettenprotonen von Ser14, $\text{H}\alpha$ von Pro3 und den Seitenkettenprotonen von Val12, $\text{H}\alpha$ von Phe5 und den Seitenkettenprotonen von Ile13, NHs von Gln6 und Thr7 und den Seitenkettenprotonen von Ile13, $\text{H}\alpha$ von Pro8 und NH von Ser14, sowie NH von Asp9 und den Seitenkettenprotonen von Ser14 beobachtet. Alle diese weitreichenden NOE-Kontakte belegen ein Hindurchfädeln des C-terminalen Schwanzes durch den aus 9 Aminosäuren bestehenden Makrolaktamring und beweisen damit das postulierte Lassostrukturmotiv. Demzufolge entspricht das isolierte Peptid dem postulierten Lassopeptid Capistruin, das anhand von Genomischem Mining aus der Genomsequenz von *B. thailandensis* E264 vorhergesagt wurde. Somit stellt Capistruin das erste Lassopeptid dar, das mittels dieses rationalen Ansatzes identifiziert und isoliert wurde.

Tabelle 4.2: Strukturelle Statistik der Familie von 15 Niedrigenergie-Strukturen von Capistruin.

NMR-Beschränkungen	Verletzungen der NMR-Beschränkungen
Total: 169	Distanzverletzungen, $>0.5 \text{ \AA}$: 0;
Distanz, $i=j$: 88	Standardabweichung: 0.018 \AA
Distanz, $ i-j =1$: 43	Diederwinkelverletzungen, $>5^\circ$: 0
Distanz, $ i-j >1$: 27	Standardabweichung: 2.1°
Diederwinkel: 8	Durchschnittliche paarweise Standardabweichung (Thr2-Phe18)
H-Brücke: 3	Rückgratome: 0.15 \AA
Beschränkungen/AS-Rest: 8.9	Alle Atome (ausgenommen H): 0.52 \AA

Der qualitativen Strukturanalyse folgte eine quantitative Strukturberechnung auf der Basis der aus den NMR-Experimenten abgeleiteten Beschränkungen. Es wurden 158 Distanzbeschränkungen bestimmt, davon 47 für das Peptidrückgrat, 23 Weitreichende und 88 für die Seitenketten. Die intramolekulare Isopeptidbindung wurde durch eine Distanzbeschränkung von 1.33 \AA zwischen dem

N α des Gly1 und dem C γ des Asp9 berücksichtigt. Insgesamt wurden 8.3 Distanzbeschränkungen pro Aminosäure für die Strukturberechnung verwendet.

Die Strukturberechnung wurde mit 500 Zufallskonformeren initiiert und die resultierenden Strukturen mit Sybyl 7.3 bearbeitet, um die Isopeptidbindung einzuführen. Anschließend wurde eine erneute Energieminimierung unter Berücksichtigung der NMR-Beschränkungen durchgeführt. Auf der Basis minimaler Verletzungen der experimentellen Beschränkungen und niedrigster Energie wurde eine Familie von 15 Strukturen ausgewählt, die eine Standardabweichung (engl. root-mean-square deviation, rmsd) für das Peptidrückgrat von 0.15 Å aufwiesen (Tabelle 4.2), und die Struktur von Capistruin in Lösung repräsentieren (Abbildung 4.7). Diese Struktur zeigte eindeutig, dass Capistruin ein neuer Vertreter der Lasso peptide ist, da der C-Terminus durch den 9-AS Makrolaktamring hindurchgefädelt ist. Das Peptidrückgrat ist sehr rigide, lediglich die drei C-terminalen Aminosäuren (Gly17, Phe18, Asn19) zeigen ein höheres Maß an Flexibilität, wie durch die Abwesenheit weitreichender NOE-Kontakte zu vermuten war. Der exozyklische, lineare C-Terminus kann bezüglich seiner Orientierung zum Makrolaktamring in drei Teile unterteilt werden. Die vier Aminosäuren Ala10-Ile13 befinden sich oberhalb des Makrolaktamrings, während die fünf C-terminalen Reste Arg15-Asn19 nach dem Hindurchfädeln unterhalb des Zyklus lokalisiert sind (Abbildung 4.8A). Ser14 dagegen ist innerhalb des 9-AS Rings positioniert, was anhand von Protonenaustauschexperimenten mit D₂O belegt wurde. Das Amidproton von Ser14 konnte nach 10 Tagen in D₂O nicht ausgetauscht werden. Dies zeigt eindeutig, dass es nicht lösungsmittlexponiert vorliegt und bestätigt somit die Lokalisierung innerhalb des Rings.

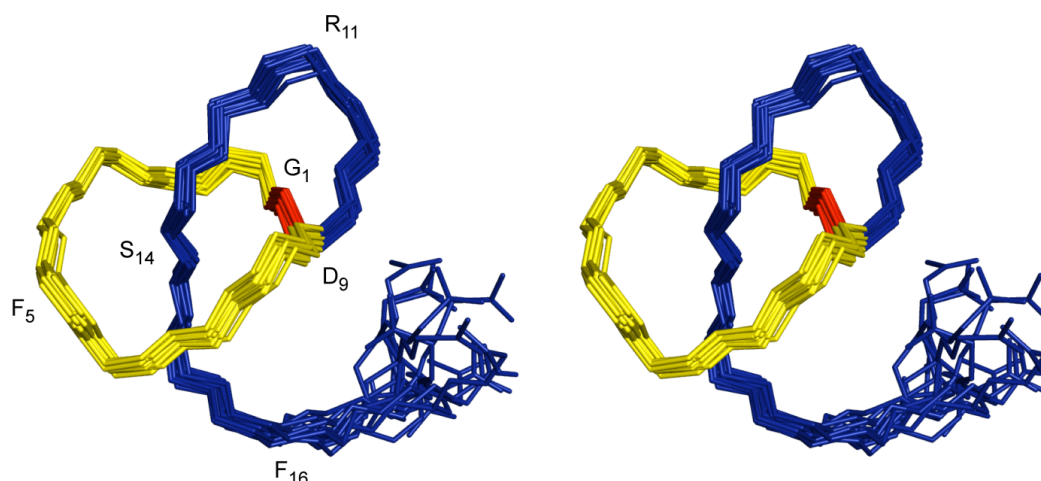


Abbildung 4.7: NMR-Struktur von Capistruin in Lösung. Stereodarstellung der Strukturüberlagerung von 15 Niedrigenergie-Strukturen. Die Strukturen sind über alle Atome des Peptidrückgrats überlagert. Die Isopeptidbindung (rot) zwischen der α -NH₂ Gruppe des Gly1 und der Seitenkettencarboxylgruppe des Asp9 führt zur Bildung des 9-AS Makrolaktamrings (gelb), durch den der lineare C-terminale Schwanz (blau) hindurchgefädelt ist.

Die Faltung des Lasso peptides ist durch ein kurzes antiparalleles β -Faltblatt charakterisiert, das durch Thr7-Pro8 und Ile13-Ser14 zwischen Teilen des Rings und des C-terminalen Schwanzes gebildet wird (Abbildung 4.8B). Die beiden β -Stränge werden durch eine Schleife verbunden, die die Reste Asp9-

Val12 umfasst. Die Lassostruktur wird durch van der Waals-Wechselwirkungen der überwiegend hydrophoben Seitenketten stabilisiert. Auf der Oberfläche des Moleküls befindet sich ein hydrophobes Patch, das durch die beiden Proline Pro3 und Pro8 sowie durch Val12 und Ile13 gebildet wird. Aufgrund der Makrolaktamstruktur besitzt Capistruin bei neutralem pH-Wert 3 Ladungen, nämlich die Guanidiniumgruppen der beiden Arginine Arg11 und Arg15 sowie die C-terminale Carboxylgruppe. Die Ladungen sind jedoch für eine konstruktive Wechselwirkung zu weit voneinander entfernt, so dass eine Stabilisierung durch eine Salzbrücke, wie sie für MccJ25 beschrieben wurde [109], ausgeschlossen werden kann (Abbildung 4.8C).

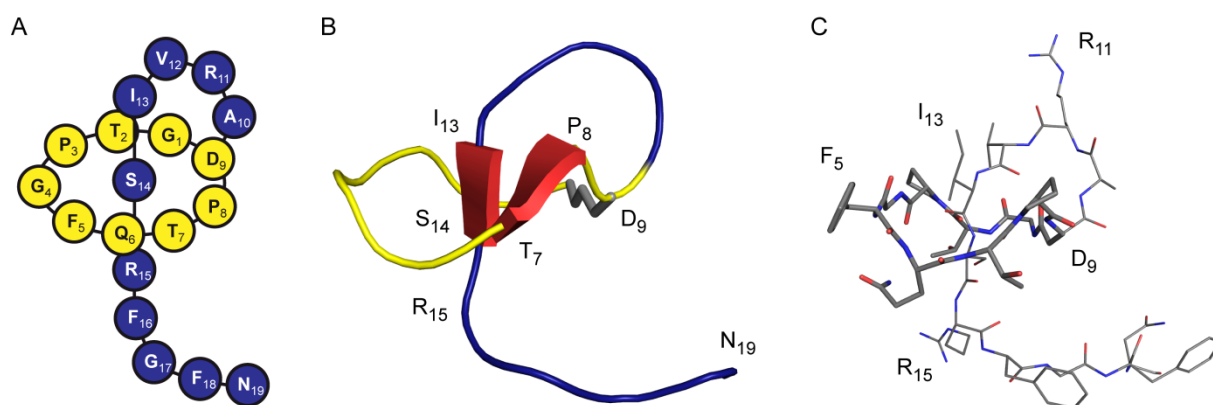


Abbildung 4.8: Strukturmerkmale von Capistruin. (A) Schematische Darstellung der Capistruinstruktur in Lösung. (B) Ribbon-Darstellung von Capistruin zur Illustration der Sekundärstrukturmerkmale charakterisiert durch ein kurzes antiparalleles β -Faltblatt (rot), das zwischen Thr7, Pro8 und Ile13, Ser14 gebildet wird. Der Makrolaktamring ist in gelb, die Isopeptidbindung in grau und der C-terminale Schwanz in blau dargestellt. (C) Capistruinstruktur in einer elementspezifischen Farbgebung (C: grau, O: rot; N: blau). Ile13 und Arg15 liegen auf gegenüberliegenden Seiten der Ringebene des Makrozyklus.

Die sterisch anspruchsvolle Seitenkette des Arg15 ist direkt unterhalb der Ringebene des Makrozyklus lokalisiert und sollte aufgrund ihrer Größe nicht in der Lage sein, den Ring zu passieren (Abbildung 4.9). Demzufolge scheint im Falle des Capistruins mit Arginin zum ersten Mal eine positiv geladene Aminosäure anstelle einer aromatischen für die nichtkovalente Verankerung innerhalb des Zyklus und damit für die Stabilisierung der entropisch nicht favorisierten Lassofaltung verantwortlich zu sein.

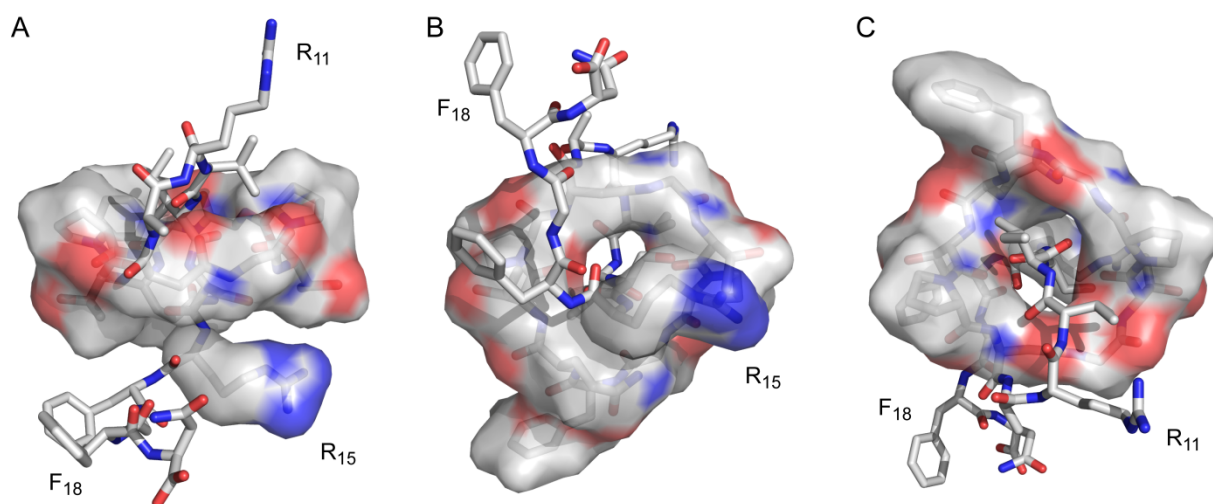


Abbildung 4.9: Sterische Fixierung des C-Terminus von Capistruin. (A) NMR-Struktur von Capistruin im Stab-Modell mit einer elementspezifischen Farbgebung (C: grau, O: rot; N: blau). Die lösungsmittelzugängliche Oberfläche des Makrolaktamrings und der Seitenkette von Arg15 sind in der gleichen Kolorierung gezeigt. Der C-terminale Schwanz von Capistruin wird aufgrund des sterischen Anspruchs der Arg-Seitenkette im Makrozyklus nicht-kovalent verankert. (B,C) Abgeleitet aus (A) durch Drehung um 270° bzw. 90° um die x-Achse.

4.1.5 Untersuchungen zur biologischen Aktivität von Capistruin

Alle bekannten Lasso peptide verfügen über eine biologische Aktivität, die sich entweder gegen virale, prokaryotische oder eukaryotische Zielmoleküle richtet. Um zu untersuchen, ob Capistruin in Analogie zu MccJ25 ebenfalls eine antibakterielle Wirkung besitzt, wurden verschiedene grampositive und gramnegative Bakterien mittels eines Agardiffusionstests auf ihre Sensitivität gegenüber Capistruin untersucht. Für sensitive Stämme wurden die MICs mit Hilfe eines Wachstumsinhibitionsassays bestimmt. Capistruin zeigte keine Aktivität gegenüber den getesteten grampositiven Stämmen, wohingegen einige der untersuchten gramnegativen Stämme sensitiv waren (Tabelle 4.3). Interessanterweise konnte das Wachstum aller untersuchten *Burkholderia*-Stämme mit MIC-Werten zwischen 12 und 100 μM Capistruin inhibiert werden. Mit einer MIC von jeweils 12 μM wurden *Burkholderia caledonica* und *B. pyrrocinia* BC011 als die sensitivsten Stämme identifiziert. Neben den analysierten *Burkholderia*-Stämmen konnte das Wachstum von *E. coli* 363 (MIC = 25 μM) und *Pseudomonas aeruginosa* AT27853 (MIC = 50 μM) durch das Peptid gehemmt werden.

Darüber hinaus wurde Capistruin gegen einige eukaryotische Zelllinien eingesetzt. Das Peptid zeigte mit IC_{50} -Werten im Bereich von 10 – 20 μM eine signifikante Aktivität gegen Mausfibroblasten L929, Brustkrebszellen MCF-7, Zervixkarzinomzellen KB-3-1 und Kolonkarzinomzellen SW-480. Im Gegensatz dazu waren die untersuchten eukaryotischen Zelllinien unempfindlich gegenüber MccJ25.

Tabelle 4.3: Biologische Aktivität von Capistruin gegenüber gramnegativen und grampositiven Bakterienstämmen sowie eukaryotischen Zelllinien.

Bakterium	MIC (µM)	Bakterium	MIC (µM)
Gramnegative Bakterien		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT27853	50
<i>Burkholderia anthina</i> J2552	100	<i>P. cremoricolorata</i>	-
<i>B. caledonica</i>	12	<i>P. oryzihabitans</i>	-
<i>B. caribensis</i>	150	<i>P. fulva</i>	-
<i>B. cepacia</i> (ATCC 25416 ^T)	100	<i>P. parafulva</i>	-
<i>B. cepacia</i> (ATCC 17759)	100	<i>P. straminea</i>	-
<i>B. dolosa</i> CEP021	100	<i>Salmonella enterica</i> Enteritidis	-
<i>B. multivorans</i> C5393	100	<i>S. enterica</i> Paratyphi SL69	-
<i>B. multivorans</i> JTC	100	<i>S. enterica</i> Thyphimurium LT2	-
<i>B. pyrrocinia</i> BC011	12	Grampositive Bakterien	
<i>B. ubonensis</i>	150	<i>Aerococcus viridans</i>	-
<i>B. vietnamiensis</i> (LMG 10929 ^T)	100	<i>Bacillus megaterium</i>	-
<i>B. vietnamiensis</i> PC 259	100	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Eukaryotische Zellen¹	
<i>Erwinia carotovora</i>	-	Mausfibroblasten L929	10
<i>Escherichia coli</i> 363	25	Brustkrebszellen MCF-7	10
<i>E. coli</i> K12 MC4100	-	Zervixkarzinomzellen KB-3-1	15
<i>E. coli</i> W3110	-	Kolonkarzinomzellen SW-480	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-		
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	-		

¹ Biologische Aktivität angegeben als IC₅₀-Werte

4.1.6 C-terminale Abbauprodukte von Capistruin

Bei der Isolierung von Capistruin aus dem Kulturüberstand von *B. thailandensis* E264 nach einer Fermentation in M9-Medium bei 37 °C für 24 h wurden zwei koeluierende Verunreinigungen mit einem *m/z*-Verhältnis der zweifach geladenen Ionen von 968.0009 bzw. 894.4643 beobachtet (Abbildung 4.10A und 4.11A). Diese *m/z*-Verhältnisse entsprachen exakt den berechneten Massen für zwei Capistruinabbauprodukte, bei denen das C-terminale Asn19 bzw. Phe18 und Asn19 fehlte. Zur näheren Charakterisierung wurden daher beide Verbindungen einer Tandem-MS-Analyse unterzogen (Abbildung 4.10B und 4.11B). Beide Verbindungen zeigten ein schwaches Fragmentierungsverhalten und eine zu Capistruin identische b-Serie. Die beobachtete y-Serie entsprach der des Capistruins korrigiert um die fehlenden C-terminalen Aminosäuren. Folglich konnten mittels MS²-Studien die koeluierenden Verbindungen als C-terminale Abbauprodukte von Capistruin identifiziert werden.

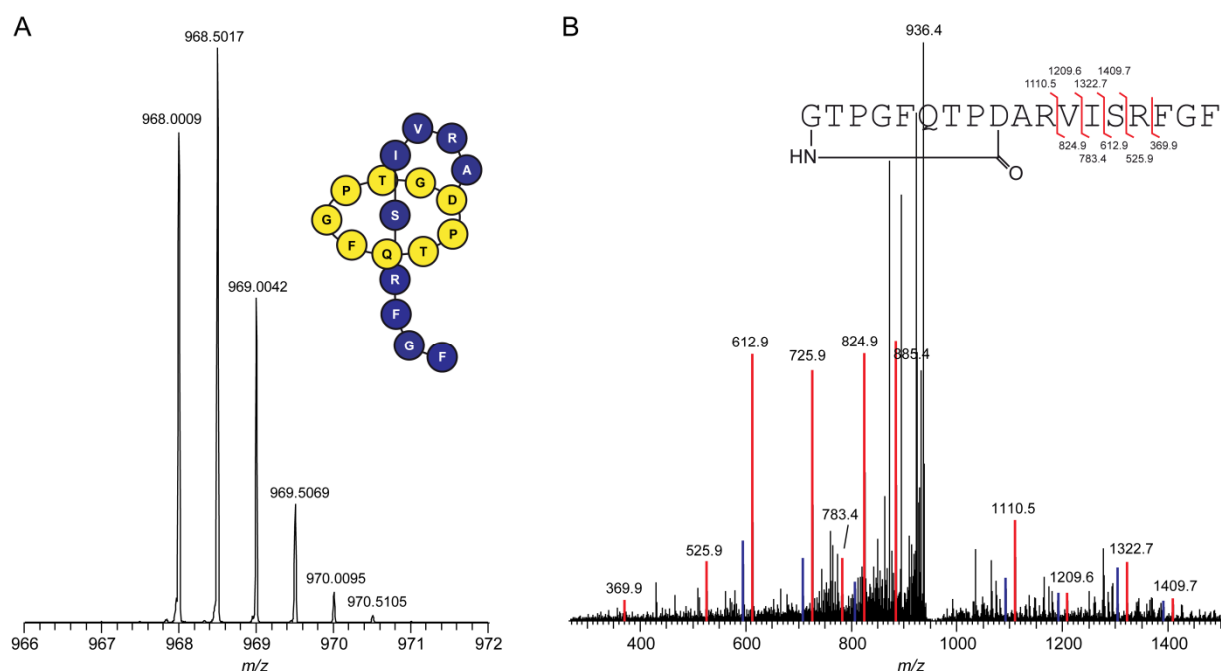


Abbildung 4.10: Capistruin ΔN - ein C-terminales Abbauprodukt von Capistruin. (A) ESI-FT-MS-Spektrum von Capistruin ΔN . $[M + 2H]^{2+}_{\text{berechnet}} = 967.9980$; $[M + 2H]^{2+}_{\text{beobachtet}} = 968.0009$; Abweichung 3 ppm. (B) MS^2 -Spektrum der m/z 968 zweifach protonierten Spezies von Capistruin ΔN . Das dominierende Signal (m/z 936.4) resultiert aus einem multiplen Verlust von Neutralkörpern (H_2O , CO und NH_3). Die rot markierten Peaks entsprechen den schematisch dargestellten b- und y-Fragmentationen. Die blau markierten Peaks stellen b- und y-Fragmentationen mit einem zusätzlichen Wasserverlust dar.

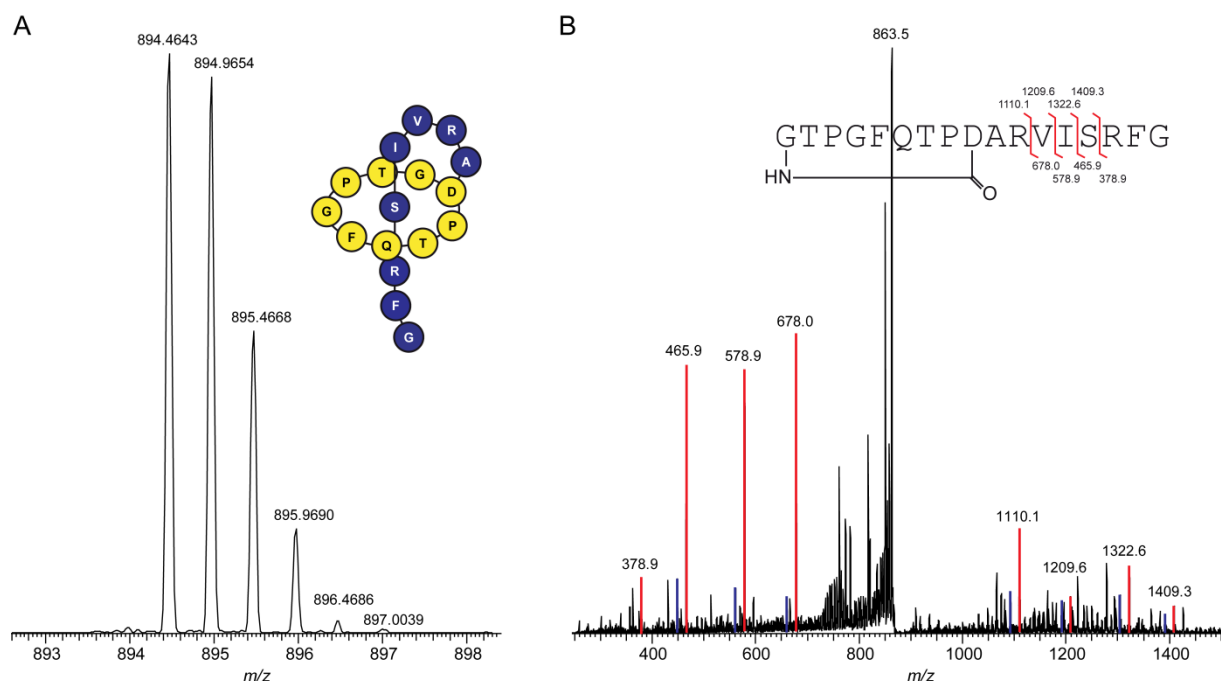


Abbildung 4.11: Capistruin ΔFN - ein C-terminales Abbauprodukt von Capistruin. (A) ESI-FT-MS-Spektrum von Capistruin ΔFN . $[M + 2H]^{2+}_{\text{berechnet}} = 894.4638$; $[M + 2H]^{2+}_{\text{beobachtet}} = 894.4643$; Abweichung 0.5 ppm. (B) MS^2 -Spektrum der m/z 894.5 zweifach protonierten Spezies von Capistruin ΔFN . Das dominierende Signal (m/z 863.5) resultiert aus einem multiplen Verlust von Neutralkörpern (H_2O , CO und NH_3). Die rot markierten Peaks entsprechen den schematisch dargestellten b- und y-Fragmentationen. Die blau markierten Peaks stellen b- und y-Fragmentationen mit einem zusätzlichen Wasserverlust dar.

Der C-terminale Abbau von Peptiden und Proteinen erfolgt in der Regel durch sogenannte carboxyterminale Exoproteasen (Carboxypeptidasen), die unspezifisch die jeweils C-terminale Aminosäure eines Peptids oder Proteins proteolytisch abspalten. Um zu untersuchen, ob der C-terminale Abbau von Capistruin *in vitro* simuliert werden kann und wie sich die Stabilität von Capistruin gegenüber Carboxypeptidasen generell verhält, wurde das Lassopeptid in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von Carboxypeptidase Y inkubiert. Dabei handelt es sich um eine Protease mit breiter Substratspezifität aus *Saccharomyces cerevisiae*. Unabhängig von der eingesetzten Enzymkonzentration und Inkubationszeit wurde lediglich die Abspaltung des C-terminalen Asn19 unter Bildung von Capistruin Δ N beobachtet (Abbildung 4.12). Eine weitere Verkürzung des Lassopeptids durch die Carboxypeptidase Y war nicht möglich.

Die Tatsache, dass Capistruin mittels Carboxypeptidase Y *in vitro* C-terminal degradiert werden kann, legt den Schluss nahe, dass auch während der Fermentation eine Carboxypeptidase aus *B. thailandensis* E264 für den Abbau verantwortlich ist. Da das sekretierte Capistruin abgebaut wird, ist anzunehmen, dass es sich bei dieser Carboxypeptidase um ein extrazelluläres Enzym handelt. Desweiteren scheint die Stabilität gegenüber Carboxypeptidasen ein weiteres Diskriminierungsmerkmal zwischen verzweigt-zyklischen und lassostrukturierten Peptiden aus proteinogenen Aminosäuren zu sein. Im Falle einer verzweigt-zyklischen Struktur wäre eine deutlichere Degradierung zu erwarten gewesen.

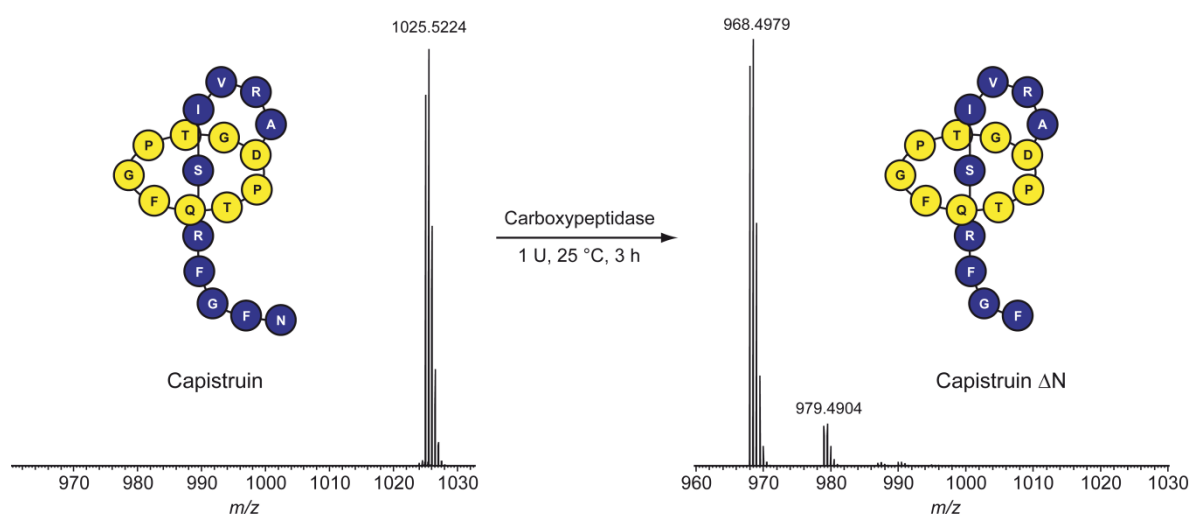


Abbildung 4.12: C-terminaler Abbau von Capistruin durch Carboxypeptidase Y. Die Inkubation von 20 ng Capistruin mit 1 U Carboxypeptidase Y für 3 h bei 25 °C führte durch Abspaltung von Asn19 zur vollständigen Konversion von Capistruin zu Capistruin Δ N. Ein weiterer C-terminaler Abbau wurde nicht beobachtet.

4.1.7 Heterologe Produktion von Capistruin in *E. coli*

Um die Notwendigkeit eines Gens oder Genclusters für die Produktion eines Naturstoffs zu beweisen, sind entweder Gen-Knockout-Studien oder die homologe/heterologe Produktion in einem Nichtproduzentenstamm die Methode der Wahl. Daher wurde das 4.5 kb *capABCD*-Gencluster aus dem Chromosom von *B. thailandensis* E264 amplifiziert und in den pET41a(+)-Vektor kloniert,

wodurch das komplette Gencluster unter Kontrolle eines T7-Promotors/lac-Operators gestellt wurde. Folglich konnte die Transkription einer polycistronischen mRNA durch IPTG-Zugabe induziert werden. Das für den Capistruinvorläufer kodierende *capA*-Gen wurde von einer artifiziellen, vektorbasierten ribosomalen Bindungsstelle (RBS) translatiert, während für *capB*, *capC* und *capD* die nativen, intrinsischen RBS verwendet wurden (Abbildung 4.13A). Alternativ dazu wurde jedes Einzelgen in eine MCS der beiden Duet-Vektoren pETDuet und pCDFDuet kloniert. Dadurch steht jedes Biosynthesegen unter T7-Promotor/lac-Operator-Kontrolle und wird von einer artifiziellen, vektorbasierten RBS translatiert. Im Gegensatz zum pET41a(+)*_capABCD*-Konstrukt werden bei diesem System vier monocistronische mRNAs in der Zelle nach IPTG-Induktion synthetisiert. Beide Vektorsysteme wurden in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und die Transformanten in M20-Medium bei 37 °C für 48 h fermentiert. Die Induktion erfolgte mit 0.05 mM IPTG bei einer OD₆₀₀ von 0.8. Es wurden sowohl die Kulturüberstände als auch deren Extrakte von induzierten und nichtinduzierten Kulturen per HPLC-MS untersucht. Eine Analyse des Kulturüberstandes des polycistronischen Ansatzes zeigte eine erfolgreiche heterologe Produktion von Capistruin (Abbildung 4.13B und C), da eine Verbindung mit dem exakten *m/z*-Verhältnis in induzierten Kulturen identifiziert werden konnte ($[M + 2H]^{2+}_{\text{heterolog}} = 1025.0212$; $[M + 2H]^{2+}_{\text{berechnet}} = 1025.0191$; $[M + 2H]^{2+}_{\text{nativ}} = 1025.0206$). Die heterolog produzierte Verbindung zeigte darüber hinaus die gleiche Retentionszeit (19.76 min) wie Capistruin (19.71 min, Abbildung 4.3A) und das gleiche Fragmentierungsspektrum. Die Produktion war IPTG-abhängig, da in nichtinduzierten Kulturen keine Capistruinproduktion beobachtet wurde. Die Ausbeute des polycistronischen Ansatzes betrug 0.2 mg/mL, was in etwa 30% der nativen Produktion entspricht.

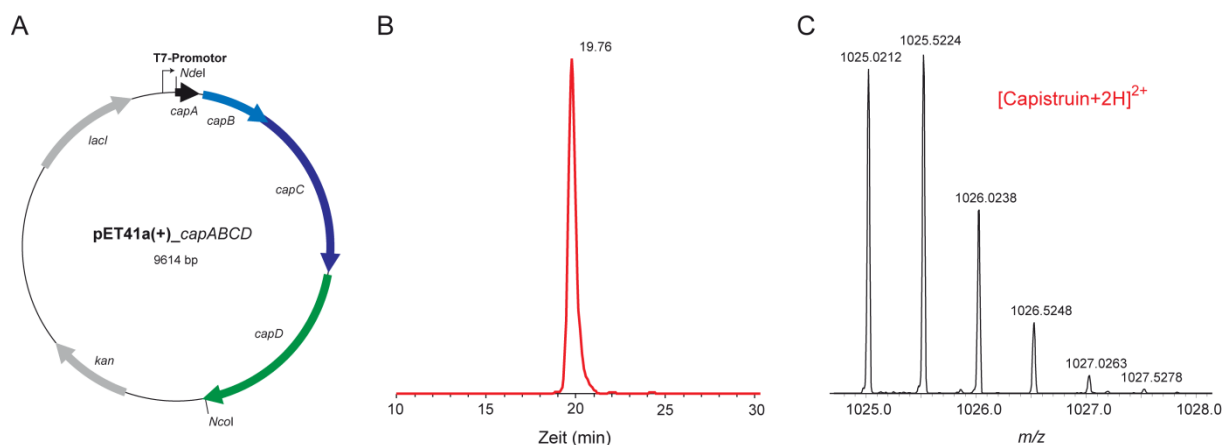


Abbildung 4.13: Heterologe Produktion von Capistruin in *E. coli* BL21(DE3). (A) Physikalische Karte des pET41a(+) basierten Plasmids, das zur heterologen Expression des *capABCD*-Genclusters in *E. coli* BL21(DE3) verwendet wurde. (B) HPLC-MS-Analyse des Kulturüberstands eines IPTG-induzierten *E. coli* BL21(DE3)-Stamms, der das pET41a(+)*_capABCD*-Plasmid trägt. Gezeigt ist ein Extrahiertes Ionenchromatogramm im Bereich von *m/z* 1025.0 – 1025.1. (C) ESI-FT-MS-Spektrum des heterolog produzierten Capistruins mit einer Retentionszeit von 19.76 min. $[M + 2H]^{2+}_{\text{berechnet}} = 1025.0191$; $[M + 2H]^{2+}_{\text{beobachtet}} = 1025.0212$; Abweichung 2 ppm.

Die heterologe Capistruinproduktion war ebenfalls stark von den Wachstumsbedingungen abhängig. Die Fermentation in M20-Medium führte wie bei *B. thailandensis* E264 zu den höchsten

Produktionsraten. In M9- und M63-Medium war Capistruin in Extrakten des Kulturüberstands nachweisbar, wohingegen in LB-Medium keine heterologe Produktion nachgewiesen werden konnte. Der monocistronische Ansatz (basierend auf den Duet-Vektoren) erlaubte ebenfalls eine erfolgreiche heterologe Produktion von Capistruin in *E. coli* BL21(DE3), jedoch war das Peptid erst nach Extraktion des Kulturüberstands nachweisbar, was auf eine 50- bis 100-fach geringere Produktion hindeutet. Vermutlich resultierte die Expression der prozessierenden Enzyme und insbesondere des Exporters von den starken Promotoren und RBS zum größten Teil in unlöslichen Proteinen aufgrund eines Faltungsdefekts.

4.1.8 Heterologe Expression und Reinigung von CapA, CapB und CapC

4.1.8.1 Heterologe Expression und Reinigung von CapA

Um das Capistruinvorläuferprotein CapA darzustellen, wurde das entsprechende Gen in den pET28a(+)-Vektor kloniert, wodurch CapA als N-terminale His(6)-Tag Fusion exprimiert werden konnte. Obwohl unterschiedliche Medien, Temperaturen, IPTG-Konzentrationen und Fermentationszeiten verwendet wurden, war eine Überexpression mittels SDS-PAGE nicht nachweisbar und eine Reinigung über Ni^{2+} -Affinitätschromatographie demzufolge nicht möglich. Von dem MccJ25-Vorläuferprotein McjA war durch CD-spektroskopische Studien bekannt, dass es in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.4 unstrukturiert vorlag [128]. Falls dieses Resultat auf CapA übertragbar wäre, würde es nach der ribosomalen Synthese intrazellulär ein ideales Substrat für Proteasen darstellen. Um den vermuteten proteolytischen Abbau zu minimieren, wurden daraufhin kurze Nachinduktionszeiten gewählt (1 h), die Zellen nach der Ernte auf 100 °C erhitzt und anschließend einer denaturierenden Ni^{2+} -Affinitätschromatographie in Gegenwart von 6 M GdmCl unterzogen. Mittels dieser Strategie war es möglich analytische Mengen des Capistruinvorläufers zu reinigen.

Eine weitere Möglichkeit unstrukturierte Proteine und Peptide vor proteolytischem Verdau zu schützen, ist die Expression als *inclusion bodies*. Dabei handelt es sich um unlösliche Aggregate aus fehl- oder teilgefalteten Proteinen, die aufgrund ihres festen Aggregatzustands kein Substrat für Proteasen darstellen. Zur Realisierung dieses Ansatzes wurde *capA* in den pET31b(+)-Vektor kloniert, der die Expression von CapA als N-terminale Ketosteroidisomerase (KSI)-Fusion ermöglichte. Die KSI zwingt das Zielprotein aufgrund ihrer sehr geringen Löslichkeit in *inclusion bodies* [151]. Das KSI-CapA Fusionsprotein zeigte eine gute Expression und die *inclusion bodies* wurden erfolgreich präpariert (Abbildung 4.14A). Nach einer Bromcyanspaltung in 70% Ameisensäure über Nacht konnte CapA ohne das N-terminale Methionin mittels präparativer RP-HPLC mit einer Ausbeute von 3 mg/L Kultur gereinigt werden (Abbildung 4.14B).

Um einen ersten Einblick in die Struktur von CapA zu erhalten, wurden CD-spektroskopische Untersuchungen von 1 mg/mL CapA in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.3 in An- und Abwesenheit von 8 mM SDS durchgeführt (Abbildung 4.14C). In polarer Umgebung (Abwesenheit von SDS) lag CapA unstrukturiert vor. Bei einer Verringerung der Polarität des Lösungsmittels durch

Zugabe von 8 mM SDS wurde dagegen die Ausbildung einer α -helikalen Struktur induziert. Ein identisches Verhalten ist bereits für McjA beschrieben worden [128].

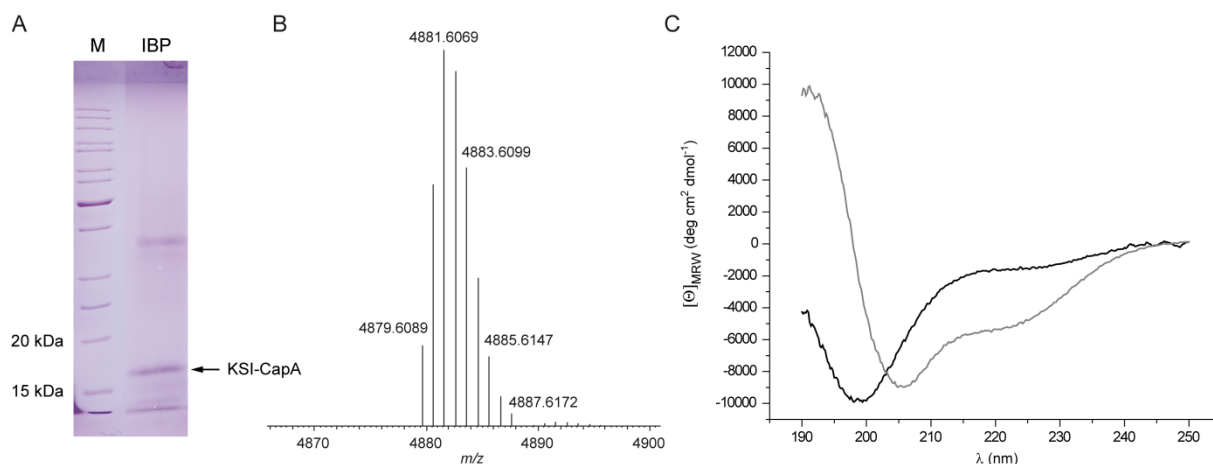


Abbildung 4.14: Reinigung und CD-spektroskopische Sekundärstrukturuntersuchungen des Capistruin-vorläuferproteins CapA. (A) SDS-PAGE-Analyse der *inclusion body* Präparation (IBP) des KSI-CapA-Fusionsproteins (MW: 18.9 kDa). M: Proteinmarker. (B) ESI-FT-MS-Spektrum von gereinigtem CapA nach Abspaltung der KSI-Fusion mittels Bromcyanspaltung. $[M + H]^+$ berechnet = 4879.6082; $[M + H]^+$ beobachtet = 4879.6089; Abweichung: 0.1 ppm. (C) Fern-UV-CD-Spektrum von 1 mg/mL CapA in 10 mM Na_2HPO_4 , pH 7.3 in Gegenwart (grau) und Abwesenheit (schwarz) von 8 mM SDS.

4.1.8.2 Heterologe Expression und Reinigung von CapB und CapC

Neben der Darstellung des Vorläuferproteins CapA ist die Reinigung der beiden prozessierenden Enzyme CapB und CapC Voraussetzung für detaillierte *in vitro*-Studien der Capistruinbiosynthese. Obwohl viele der in der Literatur beschriebenen Ansätze zur Erhöhung der Löslichkeit angewendet wurden [149,153,154,176,177], ist es im Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen, CapB und CapC in löslicher Form darzustellen. Ein Überblick der angewendeten Strategien ist Tabelle 4.4 zu entnehmen. N- oder C-terminale His(6)-Tag-Fusionen waren ebenso wie Thioredoxin-, GST- und SUMO-Fusionen bei einer Expressionstemperatur von 37 °C komplett unlöslich. Auch eine Verringerung der Temperatur auf 18 °C, was häufig zu einer Erhöhung der Löslichkeit unlöslicher Proteine führt [178], lieferte keine Verbesserung der Solubilität. Große Fusionsproteine wie MBP oder NusA resultierten dagegen in einer deutlichen Löslichkeitserhöhung und erlaubten die Aufreinigung der prozessierenden Enzyme. Allerdings fielen die Zielproteine beim Abspalten der Fusionsproteine mittels TEV-Protease sofort aus, was darauf hindeutet, dass CapB und CapC nicht richtig gefaltet vorliegen und lediglich durch die großen Fusionspartner in Lösung gehalten und vor Aggregation geschützt werden.

Tabelle 4.4: Übersicht der untersuchten Fusionsproteine der prozessierenden Enzyme CapB und CapC.

Fusion	Vektor	Enzym	Expression	Löslichkeit	Abspaltung der Fusion ¹
His(6) N-terminal	pET28a(+)	CapB	++	-	n.u.
		CapC	+	-	n.u.
His(6) C-terminal	pET28a(+)	CapB	++	-	n.u.
		CapC	+	-	n.u.
Thioredoxin	pBAD102	CapB	++	-	n.u.
		CapC	++	-	n.u.
GST	pET41a(+)	CapB	++	-	n.u.
		CapC	++	-	n.u.
SUMO	pET SUMO	CapB	+	-	n.u.
		CapC	+	-	n.u.
MBP	pETMBP_1a	CapB	+++	+	+, Präzipitation
		CapC	+++	+	+, Präzipitation
NusA	pETNusA_1a	CapB	+++	++	+, Präzipitation
		CapC	+++	++	+, Präzipitation

¹ n.u.: aufgrund der Unlöslichkeit nicht untersucht.

4.1.9 *In vitro* Rekonstitution der Biosynthese von Capistruin

Da das Vorläuferprotein CapA mit Hilfe des KSI-Ansatzes erfolgreich gereinigt werden konnte und die Verwendung großer N-terminaler Fusionen wie MBP und NusA die Aufreinigung der prozessierenden Enzyme CapB und CapC erlaubte, wurde versucht, mit Hilfe dieser Komponenten die Biosynthese von Capistruin *in vitro* zu rekonstituieren. Allerdings konnte bei Verwendung der MBP- oder NusA-Fusionen von CapB und CapC keine Reifung oder Modifikation des Vorläuferproteins beobachtet werden. Der Einsatz der unfusionierten prozessierenden Enzyme war aufgrund ihrer Unlöslichkeit nicht möglich. Vermutlich liegen die Reifungsenzyme in den Fusionen in einer inaktiven, fehlgefalteten Konformation vor, oder die großen Fusionsproteine inhibieren eine für die Katalyse essentielle Interaktion.

4.1.10 Mutationsstudien zur Reifung des Lasso-peptids Capistruin

Die sehr geringe Löslichkeit der rekombinant hergestellten Reifungsenzyme CapB und CapC limitiert bisher detaillierte *in vitro* Studien der Capistruinbiosynthese. Um dennoch ein tieferes Verständnis der Reifungsreaktionen zu gewinnen, wurden Mutationsstudien des Capistruinvorläuferproteins CapA unter Verwendung des heterologen Produktionssystems in *E. coli* durchgeführt (siehe Abschnitt 4.1.7). Um bei der Mutagenese nicht den pET41a(+)-*capABCD*-Vektor als Templat verwenden zu müssen, wurde zunächst ein auf zwei Vektoren basierendes Expressionssystem entwickelt (Abbildung 4.15). Ein Vektor sollte die Gene für die Biosynthesemaschinerie und den Exporter enthalten, der zweite lediglich das Gen für das Vorläuferprotein. Dieser könnte dann als Templat zur Generierung der *capA*-Mutanten verwendet werden. Diese Strategie würde zum einen zu einer

Vereinfachung der Mutagenese und zum anderen zu einer Reduzierung der Sequenzierungskosten führen. Zur Evaluierung dieses Ansatzes wurde *capA* in den pCDFDuet-Vektor kloniert. In das *capA*-Gen auf dem pET41a(+)-*capABCD*-Vektor wurde eine T27P-Mutation eingeführt, wodurch die Capistruinproduktion inhibiert wurde. Durch Komplementation mit dem pCDFDuet-*capA*-Vektor konnte die heterologe Produktion wieder hergestellt werden und lag mit 0.1 – 0.2 mg/L Kultur im Bereich des 1-Vektorsystems. Folglich wurde der pCDFDuet-*capA*-Vektor als Templat für die Generierung aller in dieser Arbeit beschriebenen Mutanten verwendet. Nach Kotransformation mit pET41a(+)-*capA*BCD* wurden die Transformanten fermentiert und die Zellpellets und Kulturüberstände bezüglich der Produktion von Capistruin oder Capistruinderivaten per HPLC-MS analysiert.

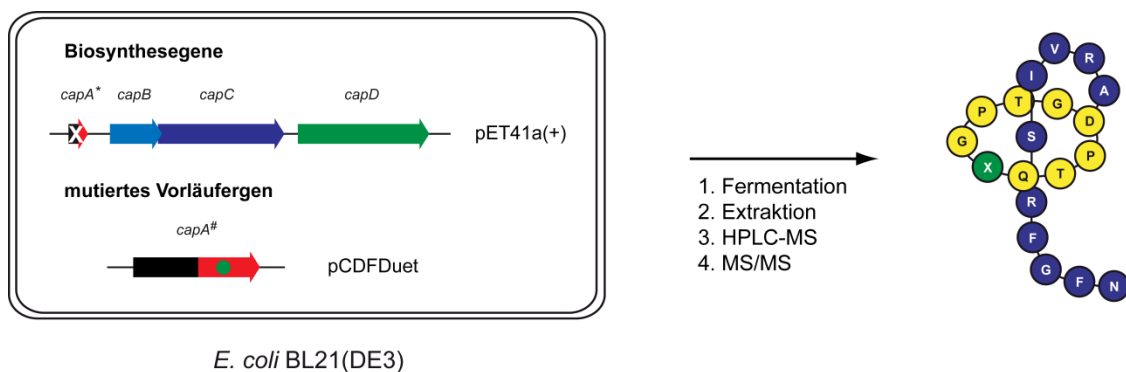


Abbildung 4.15: 2-Vektor-System zum Screening der heterologen Produktion von Capistruinvarianten.

4.1.10.1 Mutationsanalyse der Proteaseschnittstelle von CapA

Die postulierten Reifungsreaktionen der Capistruinbiosynthese beinhalten unter anderem die proteolytische Spaltung von CapA zwischen His28 und Gly29, die vermutlich durch CapB katalysiert wird. Um kritische Positionen dieser Spaltungsreaktion zu bestimmen, wurde ein Alaninscan der P4- bis P1'-Position von CapA (Ser25-Gly29) durchgeführt (Abbildung 4.16). Die Substitution von Ser25, Ser26 und His28, die der P4-, P3- bzw. P1-Position entsprechen, durch Alanin hatte keinen Einfluss auf die Produktion von Capistruin. Dagegen wurde durch die Alaninsubstitution von Thr27 an der P2-Position die Capistruinproduktion vollständig unterdrückt und konnte auch nicht durch einen konservativen T27S-Austausch regeneriert werden. Außerdem war Gly29 an der P1'-Position, das die erste Aminosäure im gereiften Lassozeptid repräsentiert, nicht durch Alanin ersetzbar, da die resultierende Capistruin G1A-Variante nicht nachgewiesen werden konnte.

		P ₄ P ₃ P ₂ P ₁ P ₁ '						Mutation	Lassozeptid
CapA	MVRLAKLLRSTIHGSNGVSLDAV	S ₂₅	S	T	H	G	TPGFQTPDARVISRFGFN	S25A	+
	Leaderpeptid						Lassosequenz	S26A	+
								T27A	–
								T27S	–
								H28A	+
								G29A	–

Abbildung 4.16: Mutationsanalyse der Proteaseschnittstelle von CapA. Ein Alaninscan von Ser25 – Gly29 (P4 – P1'-Position der Proteaseschnittstelle) identifizierte Thr27 und Gly29 als kritische Aminosäuren für die Capistruinproduktion. Die Lassozeptidbiosynthese konnte nicht durch eine konservative T27S-Mutation regeneriert werden.

4.1.10.2 Alaninscan der Lassozeptidsequenz

Neben der Analyse der Proteaseschnittstelle wurde ein Alaninscan der Lassozeptidsequenz durchgeführt, um zu untersuchen, welche Positionen des Lassozeptids kritisch für dessen Produktion sind. Mit Ausnahme von Asp9 konnten 14 der 18 Positionen durch Alanin ersetzt werden, ohne die Biosynthese von Capistruin zu inhibieren (Abbildung 4.17A). Mit Thr2-Pro8 waren alle Aminosäuren des Makrolaktamrings, die nicht an der intramolekularen Zyklisierung beteiligt sind, durch Alanin substituierbar. Ebenso konnten die C-terminalen Aminosäuren Ser14-Asn19, die innerhalb oder unterhalb des Makrolaktamrings lokalisiert sind, durch Alanin ersetzt werden. Die Produktionsraten dieser Capistruinvarianten lagen nach Abschätzung durch Peakintegration extrahierter Ionenchromatogramme (engl. extracted ion chromatograms, EIC) im Bereich von 0.01 – 0.05 mg/L Kultur und damit signifikant niedriger im Vergleich zum Wildtyp (0.1 – 0.2 mg/L).

Die Lassostruktur der produzierten Varianten wurde durch Fragmentierungsstudien in der Gasphase analysiert. Exemplarisch ist das MS²-Spektrum der *m/z* 1010 zweifach protonierten Spezies der Capistruin T2A-Variante in Abbildung 4.17B dargestellt. Das Spektrum zeigt ein zum Capistruinspektrum analoges schwaches Fragmentierungsverhalten, da die dominierenden Ionen aus dem Verlust von Neutalmolekülen wie H₂O, CO oder NH₃ resultierten, was auf eine kompakte und rigide Peptidstruktur hindeutet. Die übrigen Fragmentionen niedriger Intensität gingen aus Peptidbindungsbrüchen innerhalb des C-Terminus hervor. Analog zu Capistruin waren alle beobachteten Bindungsbrüche C-terminal zu Arg11 lokalisiert. Zusammengefasst sind alle Resultate mit dem Fragmentierungsverhalten von Capistruin konsistent und weisen daher auf die Faltung von Capistruin T2A sowie aller anderen Alaninderivate in die kompakte Lassostruktur hin.

Die vier Positionen, die nicht durch Alanin ersetzt werden konnten, waren Gly1 und die drei Aminosäuren des Schleifenmotivs Arg11, Val12 und Ile13. Die beiden hydrophoben Aminosäuren Val12 und Ile13 konnten durch Leucin ersetzt werden. Demzufolge toleriert die Biosynthesemaschinerie konservative Substitutionen an diesen beiden Positionen. Im Gegensatz dazu wurde die R11K-Variante nicht produziert, womit Arg11 eine essentielle Rolle bei der Biosynthese von Capistruin zuzukommen scheint. Da Lassoptide der Klasse I über ein Cystein an Position 1 verfügen, wurde ferner eine G1C-Mutante hergestellt. Eine Produktion dieses Derivats konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Asp9 nimmt eine entscheidende Rolle bei der Capistruinbiosynthese ein, da dessen Seitenkettencarboxylgruppe das Elektrophil in der Makrozyklisierungsreaktion darstellt. Folglich ist lediglich eine Substitution mit Glutamat chemisch sinnvoll, da alle anderen proteinogenen Aminosäuren nicht die Zyklisierung und somit auch nicht die Ausbildung der Lassostruktur gestatten würden. Allerdings verhinderte die D9E-Substitution, die einer Ringerweiterung um eine Methylengruppe entspricht, die Reifung des Vorläufers in das Capistruinderivat.

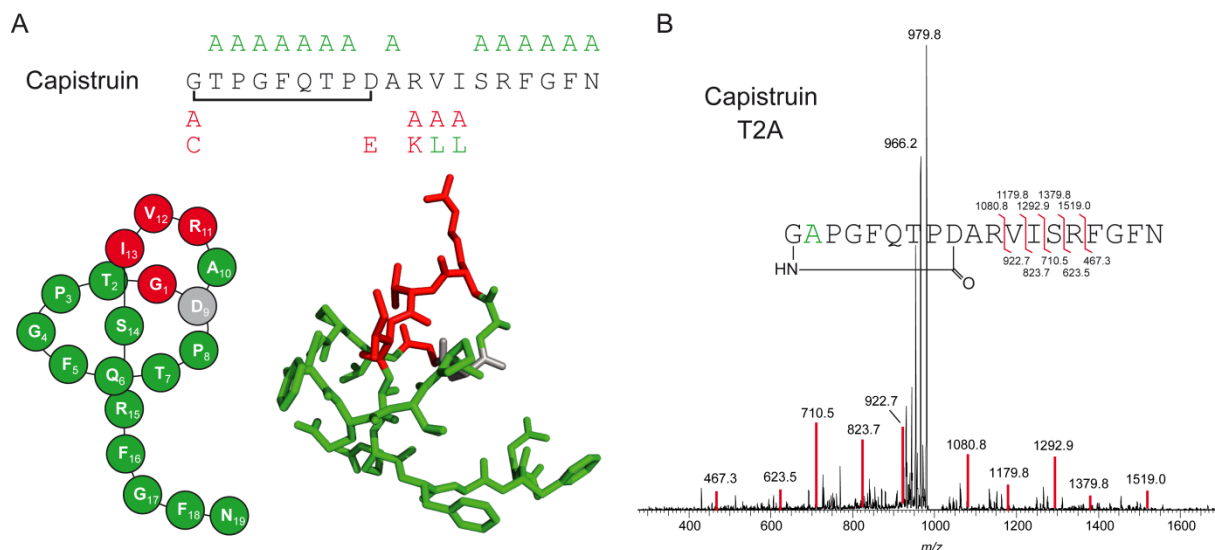


Abbildung 4.17: Mutationsanalyse von Capistruin. (A) Übersicht der untersuchten Einzelsubstitutionen innerhalb der Lassosequenz von Capistruin. Der Einfluss der einzelnen Mutationen ist farblich einem Ampelschema entsprechend dargestellt (grün: Substitution liefert lassostrukturierte Capistruinderivate; rot: keine Produktion). Die Ergebnisse des Alaninscans sind auf das Capistruinschema und die NMR-Struktur als Stabmodell unter Verwendung der gleichen Farbgebung abgebildet. (B) MS²-Spektrum der m/z 1010.0 doppelt protonierten Spezies von Capistruin T2A. Die dominierenden Signale (m/z 966.2 und 979.8) resultieren aus einem multiplen Verlust von Neutalmolekülen (H_2O , CO oder NH_3). Die rot markierten Peaks entsprechen den schematisch dargestellten b- und y-Fragmenten.

4.1.10.3 Engineering der Lassostruktur von Capistruin

Um zu untersuchen, ob die 19-AS Lassostruktur von Capistruin modifiziert werden kann, wurden 15 Mutanten durch C-terminale Verkürzung bzw. Verlängerung sowie durch Ringerweiterung bzw. -verkleinerung generiert (Tabelle 4.5). Stopcodons konnten erfolgreich an den Positionen Asn19, Phe18 und Gly17 eingeführt werden und führten zur Produktion von Capistruinderivaten mit einer Länge von 18, 17 und 16 Aminosäuren. Weitere Verkürzungen durch Stopcodoninsertion wurden von der Biosynthesemaschinerie nicht toleriert. Das C-terminale Anfügen eines zusätzlichen Alanins erlaubte die Produktion einer 20-AS Capistruinvariante. Darüber hinaus inhibierten zusätzlich angefügte Alaninreste die Lasso-peptidsynthese. Erstaunlicherweise lieferte weder die Ringerweiterung durch Insertion von Alanin oder Glycin zwischen Gly4-Phe5 oder Phe5-Gln6 noch die Ringverkleinerung durch Deletion von Gly4, Phe5 oder Gln6 Capistruinvarianten mit einem aus 8 bzw. 10 Aminosäuren bestehenden Makrolaktamring.

Tabelle 4.5: Übersicht der konstruierten Mutanten zur Untersuchung des Lasso-Engineering Potentials von Capistruin.

Mutation	Lassopeptid	Mutation	Lassopeptid
C-terminale Verkürzung		Ringerweiterung	
N19stop	+	G4-G-F5 Insertion	-
F18stop	+	G4-A-F5 Insertion	-
G17stop	+	F5-G-Q6 Insertion	-
F16stop	-	F5-A-Q6 Insertion	-
R15stop	-		
C-terminale Verlängerung		Ringverkleinerung	
A20 (+A)	+	G4 Deletion	-
A20A21 (+2A)	-	F5 Deletion	-
A20A21A22 (+3A)	-	Q6 Deletion	-

4.1.10.4 Fixierung des C-Terminus durch Arg15 innerhalb des Makrolaktamrings

Capistruin besitzt mit Arg11, Ile13, Arg15, Phe16 und Phe18 fünf sterisch anspruchsvolle Aminosäuren innerhalb des linearen C-terminalen Schwanzes. Davon sind in der NMR-Struktur lediglich die drei letztgenannten unterhalb der Ringebene des Makrozyklus lokalisiert und kommen daher als Stöpsel zur sterischen Fixierung in Frage. Arg15 ist dabei direkt unterhalb der Ringebene positioniert und damit sehr wahrscheinlich für die Verankerung verantwortlich. Da die Biosynthesemaschinerie einzelne Alaninsubstitutionen im C-terminalen Bereich von Capistruin tolerierte, wurden die möglichen Doppel- und Dreifach-Alaninmutanten der drei sterisch anspruchsvollen Reste generiert, um deren Einfluss auf die Capistruinstabilität zu untersuchen. Zwei Doppelmутanten, nämlich Capistruin R15A/F16A und Capistruin F16A/F18A, wurden im heterologen Produktionssystem synthetisiert, wohingegen Capistruin R15A/F18A und die Dreifachmutante nicht detektiert werden konnten.

Capistruin F16A/F18A enthält lediglich noch Arg15 als sterisch anspruchsvolle Aminosäure, die als Stöpsel zur Fixierung des C-Terminus fungieren kann. Um zu untersuchen, ob Arg15 alleine in der Lage ist, die Lassostruktur von Capistruin zu stabilisieren, wurden Fragmentierungsexperimente in der Gasphase mit der m/z 949 doppelt protonierten Spezies von Capistruin F16A/F18A durchgeführt. Das MS^2 -Spektrum von Capistruin F16A/F18A zeigt ein schwaches Fragmentierungsverhalten, wobei die intensivsten Ionen aus einem Verlust von Neutalmolekülen hervorgingen (Abbildung 4.18). Die verbleibenden Ionen niedriger Intensität gingen auf Peptidbindungsbrüche innerhalb des C-Terminus des Capistruinderivats zurück. Da das Fragmentierungsmuster mit dem des Capistruins übereinstimmt, kann von einer Lassostruktur des Capistruins F16A/F18A ausgegangen werden. Somit ist Arg15 alleine für die sterische Fixierung des C-terminalen Schwanzes innerhalb des Makrolaktamrings verantwortlich.

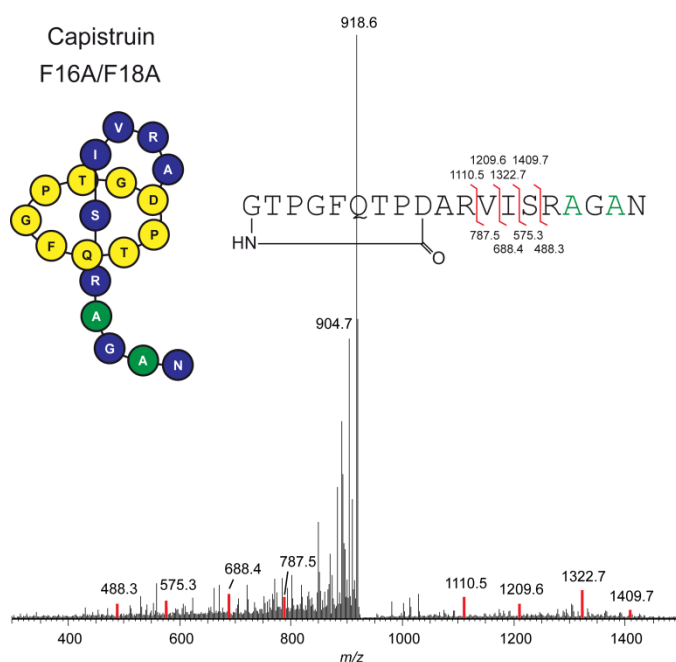


Abbildung 4.18: Fragmentierungsanalyse von Capistruin F16A/F18A. MS²-Spektrum der m/z 949.0 zweifach protonierten Spezies des Capistruin F16A/F18A-Derivats. Die beiden Alaninsubstitutionen sind in grün hervorgehoben. Die dominierenden Tochterionen resultieren aus einem Verlust mehrerer Neutalmoleküle (H₂O, NH₃ und CO). Rot markierte Peaks entsprechen den schematisch dargestellten b- und y-Fragmenten.

4.1.10.5 Capistruin R15A/F16A stellt ein temperatursensitives Lassopeptid dar

Neben Capistruin F16A/F18A wurde auch die Doppelalaninmutante Capistruin R15A/F16A von der Biosynthesemaschinerie prozessiert. Die Variante enthält mit Phe18 lediglich noch eine der ursprünglich drei voluminösen Aminosäuren. Diese befindet sich im Gegensatz zu Capistruin F16A/F18A nicht an Position 15 des Lassopeptids, sondern an Position 18, also deutlich näher am C-Terminus. Anhand dieser Variante sollte untersucht werden, ob Phenylalanin in ähnlicher Weise wie Arginin in der Lage ist, den C-Terminus stabil innerhalb des 9-AS Makrozyklus zu verankern.

Bei der HPLC-MS-Analyse eines Kulturüberstandextrakts von Capistruin R15A/F16A-produzierenden Zellen zeigte das EIC zwei Verbindungen mit dem für die Variante berechneten m/z -Verhältnis, die sich in ihren Retentionszeiten um 2 min unterschieden (22 und 24 min). Da in den Extrakten aller anderen Capistruinderivate jeweils nur eine Verbindung mit dem erwarteten m/z -Verhältnis beobachtet worden war, legte dieser Befund das Vorliegen zweier unterschiedlicher Konformationen nahe, am wahrscheinlichsten einer Lassostruktur und einer verzweigt-zyklischen Struktur. Um zwischen diesen beiden Konformationen zu unterscheiden, wurden beide anhand von Fragmentierungsstudien untersucht (Abbildung 4.19). Die beobachteten b- und y-Fragmente, die aus Peptidbindungsbrüchen innerhalb des linearen C-Terminus hervorgingen, bewiesen zweifelsfrei, dass beide Verbindungen mit der Primärstruktur von Capistruin R15A/F16A übereinstimmten. Jedoch zeigte keine das prototypische Fragmentierungsmuster der lassostrukturierten Capistruinderivate, da weder der dominierende Verlust von Neutalmolekülen noch die C-terminalen Fragmente niedriger

Intensität beobachtet wurden. Stattdessen ergaben beide Verbindungen Fragmentionen des C-terminalen Schwanzes in hohen Ausbeuten, was eine verzweigt-zyklische Struktur implizierte.

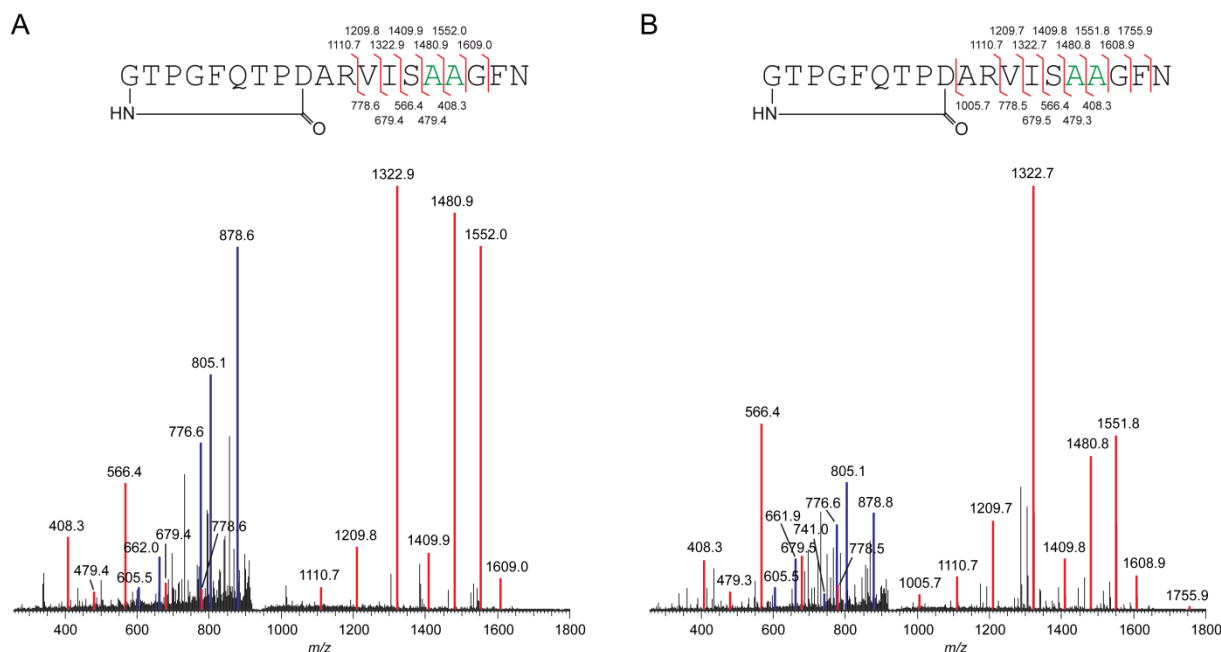


Abbildung 4.19: Fragmentierungsstudien mittels Tandem-Massenspektrometrie der beiden Capistruin R15A/F16A Konformere. A) MS²-Spektrum der m/z 944 zweifach protonierten Form des Konformers mit einer Retentionszeit von 22 min. B) MS²-Spektrum der m/z 944 zweifach protonierten Form des Konformers mit einer Retentionszeit von 24 min. Die rot markierten Peaks entsprechen den schematisch dargestellten b- und y-Fragmentationen. Blaue Peaks repräsentieren zweifach geladene b-Ionen. Die Alaninsubstitutionen sind in der Primärstruktur grün hervorgehoben.

Neben dem Fragmentierungsverhalten ist die Sensitivität gegenüber proteolytischer Hydrolyse eine zweite Methode, um zwischen verzweigt-zyklischen und lassostrukturierten Peptiden zu unterscheiden. Lasso-peptide sind in der Regel stabil gegen proteolytischen Abbau durch Endoproteasen, da der lineare C-Terminus durch seine Lokalisation innerhalb des Makrolaktamrings geschützt ist, während der lineare Teil verzweigt-zyklischer Peptide ungeschützt vorliegt und damit proteolyse-labil ist. Da durch die beiden Mutationen zwei Alanine innerhalb des C-Terminus eingebaut worden sind, wurde die Endoprotease Elastase verwendet, die Peptidbindungen nach kleinen, hydrophoben Aminosäuren (z.B. Glycin, Alanin, Valin) spaltet, um Konformationsunterschiede zu untersuchen. Durch Behandlung des Extrakts mit Elastase wurde die früher eluierende Verbindung (t_R : 22 min) vollständig hydrolisiert (Abbildung 4.20), wohingegen die Verbindung mit einer Retentionszeit von 24 min nicht beeinflusst wurde, was eine Lassostruktur implizierte. Ein Erhitzen des Elastase-behandelten Extrakts, der lediglich die 24 min Verbindung enthielt, auf 95 °C für 1 h führte zu einer vollständigen Konversion in die 22 min Verbindung, die durch weitere Elastasebehandlung komplett verdaut werden konnte.

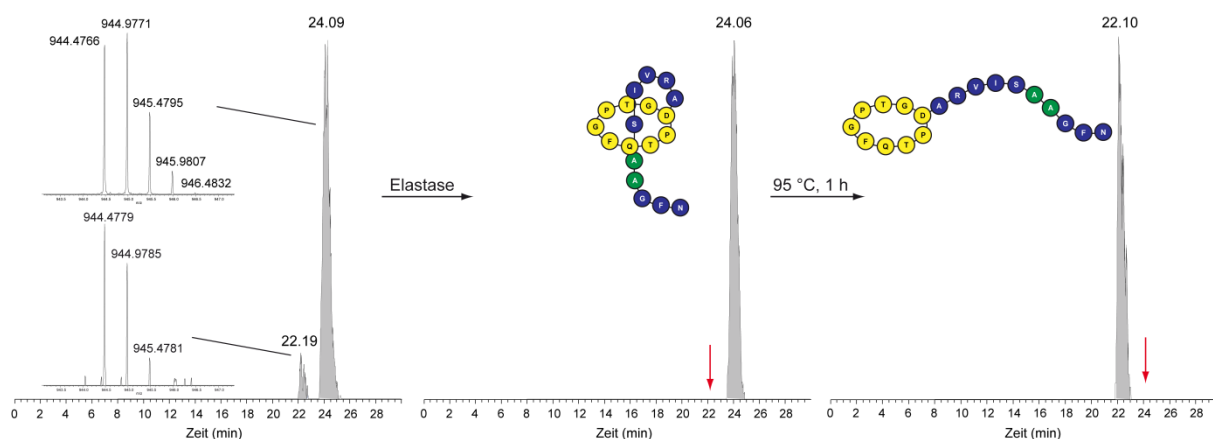


Abbildung 4.20: Temperatur-induzierte Entfaltung der Lassostruktur von Capistruin R15A/F16A. In extrahierten Ionenchromatogrammen ($m/z = 944.4 - 944.5$) eines Kulturüberstandextrakts von Capistruin R15A/F16A-produzierenden Zellen wurden zwei Verbindungen (t_R : 22.19 und 24.09 min) detektiert, die dem berechneten m/z -Verhältnis der zweifach protonierten Spezies von Capistruin R15A/F16A entsprachen ($[M+2H]^{2+}_{\text{berechnet}} = 944.4716$). Die früher eluierende Verbindung (t_R : 22 min) wurde bei einer Behandlung mit Elastase abgebaut. Die Elastase-insensitive Verbindung (t_R : 24 min) konnte durch Inkubation bei 95 °C in die 22 min Verbindung konvertiert werden. Eine erneute Elastasebehandlung der hitzebehandelten Probe führte zu einem vollständigen Verdau. Die unterschiedliche Elastasesensitivität deutet darauf hin, dass die 24 min Verbindung dem lassostrukturierten Konformer entspricht, während die 22 min Verbindung ein verzweigt-zyklisches Peptid repräsentiert.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass Capistruin R15A/F16A ein temperatursensitives Lassopeptid darstellt, da sich eine kleine Fraktion bereits während der Fermentation in ein verzweigt-zyklisches Peptid entfaltet. Diese entfaltete Konformation hat eine reduzierte Retentionszeit (22 min) und ist sensitiv gegenüber Proteolyse durch Elastase. Dagegen wird das dominierende lassostrukturierte Peptid im Extrakt (24 min) nicht durch Elastase verdaut, kann aber durch Entfaltung bei höheren Temperaturen in die verzweigt-zyklische Konformation und damit in ein Substrat für Elastase überführt werden.

4.1.10.6 Analyse des Fixierungspotentials sterisch anspruchsvoller Aminosäuren

Die beiden Doppelalaninvarianten Capistruin F16A/F18A und Capistruin R15A/F16A haben gezeigt, dass Arg15 den C-Terminus stabil im Ring fixieren, wohingegen Phe18 bei erhöhter Temperatur das Ausfädeln nicht verhindern kann. Um zu untersuchen, welche Aminosäuren an Position 15 die Bildung einer stabilen Lassostruktur erlauben, wurde Arg15 durch sieben sterisch anspruchsvolle Aminosäuren ersetzt. Dabei fand die Generierung der Mutanten ausschließlich im F16A/F18A Hintergrund statt, damit lediglich die eingesetzte Aminosäure als Stöpsel wirken kann (Abbildung 4.21A).

Bei der Substitution von Arg15 durch Ile, Met oder His konnte keine Verbindung der entsprechenden Masse nachgewiesen werden (Abbildung 4.21B). Dies liegt entweder in der fehlenden Prozessierung der CapA-Varianten oder in der Instabilität der Lassostruktur begründet, die zu einem schnellen proteolytischen Abbau führen könnte. Dagegen lieferte der Ersatz durch Lys, Phe, Tyr und Trp

lassostrukturierte Capistruinvarianten, wie durch das Fragmentierungsverhalten und die Insensitivität gegenüber Elastase bewiesen wurde.

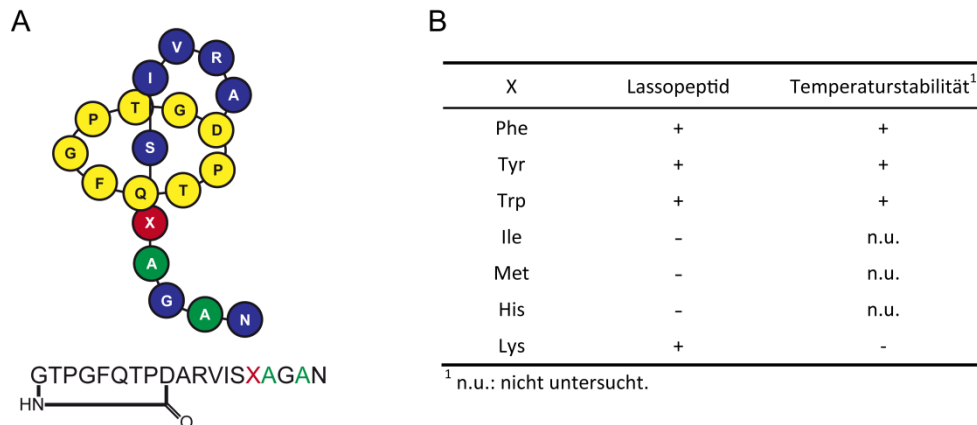


Abbildung 4.21: Untersuchung des Fixierungspotentials sterisch anspruchsvoller Aminosäuren an Position 15 von Capistruin F16A/F18A. A) Schematische Darstellung der untersuchten Capistruinvarianten. Die variable Position 15 ist in rot hervorgehoben. B) Zusammenfassung der Produktion und Thermostabilität der getesteten Aminosäuresubstitutionen an Position 15.

Bei der Analyse der Thermostabilität zeigte sich, dass eine Substitution des Arginins durch die aromatischen Aminosäuren Phe, Tyr oder Trp in temperaturstabilen Lassozeptiden resultierte (Abbildung 4.21B). Es konnte nach 5-stündiger Inkubation bei 95 °C weder eine Retentionszeitverschiebung noch die Entstehung eines zweiten Konformers beobachtet werden. Dagegen war Lysin nicht in der Lage, den C-Terminus bei 95 °C stabil im Ring zu verankern, da ein Erhitzen der Elastase-insensitiven Variante zur Bildung eines Elastase-sensitiven Konformers führte (Abbildung 4.22).

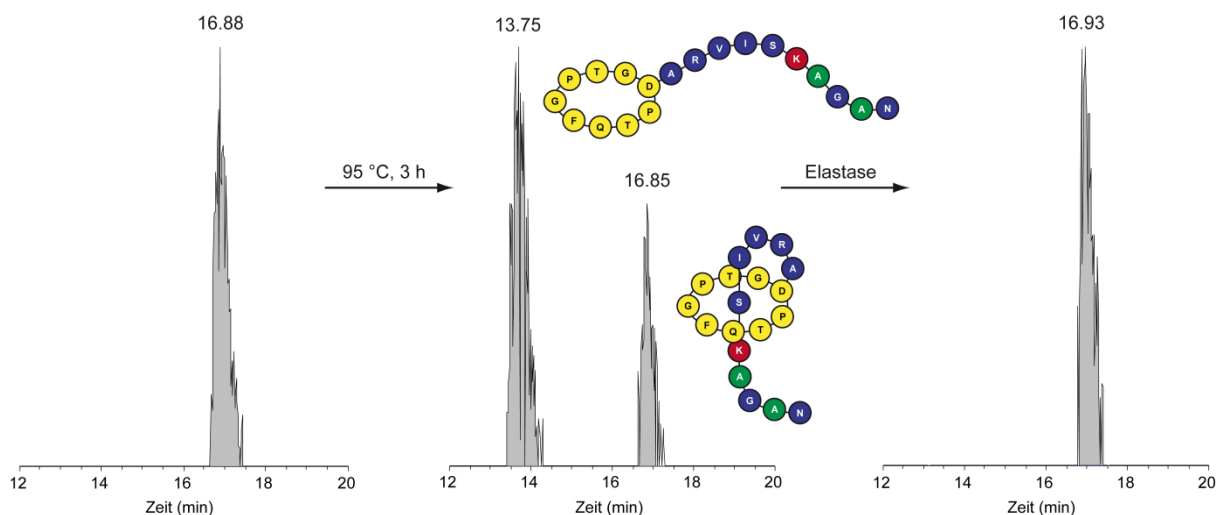


Abbildung 4.22: Untersuchung der Temperaturstabilität von Capistruin R15K/F16A/F18A. Das extrahierte Ionenchromatogramm ($m/z = 934.9 - 935.0$) des Kulturüberstandsextrakts zeigte das Vorliegen einer Konformation von Capistruin R15K/F16A/F18A an (t_R : 16.88 min). Eine Inkubation bei 95 °C für 3 h führte zur Bildung einer zweiten Konformation mit einer geringeren Retentionszeit (t_R : 13.75 min), die durch Elastasebehandlung im Gegensatz zur Ursprungskonformation vollständig verdaut wurde.

Interessanterweise scheint die Entfaltung im Vergleich zu Capistruin R15A/F16A deutlich verlangsamt zu sein und konnte auch nicht durch Zugabe starker Denaturierungsmittel (z.B. 3 M GdmCl) beschleunigt werden. Außerdem ist hervorzuheben, dass Phenylalanin an Position 15 zu einer hitzestabilen Capistruinvariante führt, während es an Position 18 nicht in der Lage ist, den C-Terminus thermostabil im makrozyklischen Ring zu verankern.

4.1.10.7 Einfluss des Leaderpeptids auf die Capistruinbiosynthese

Alle ribosomal synthetisierten Peptide, bei denen das Vorläuferprotein bekannt ist, verfügen über ein Leaderpeptid, das in der Regel im Laufe der Biosynthese abgespalten wird. Die Funktion dieser Leaderpeptide ist bisher wenig verstanden und Gegenstand vieler Diskussionen. Bei den bisher beschriebenen Mutationsstudien des Capistruinvorläufers CapA wurden bis auf die P4 – P1-Position der Proteaseschnittstelle alle Mutationen innerhalb der Lassosequenz durchgeführt. Bezüglich des 28-AS Leaderpeptids von CapA stellte sich daher die Frage, inwieweit es N-terminal verkürzt werden kann, ohne die Capistruinbiosynthese zu unterbinden. Um den Einfluss des Leaderpeptids auf die Capistruinbiosynthese zu untersuchen, wurden N-terminal verkürzte CapA-Varianten generiert, bei denen die ersten 2, 3, 5 und 10 Aminosäuren durch ein Methionin ersetzt waren (Abbildung 4.23).

	Leaderpeptid	Lassosequenz			
CapA	MVRLAKLLRSTIHG	SVSLDAVSSTH	GT	PGFQTPDARVISRFGFN	
CapA -2	MRLAKLLRSTIHG	SVSLDAVSSTH	GT	PGFQTPDARVISRFGFN	
CapA -3	MLLAKLLRSTIHG	SVSLDAVSSTH	GT	PGFQTPDARVISRFGFN	
CapA -5	MAKLLRSTIHG	SVSLDAVSSTH	GT	PGFQTPDARVISRFGFN	
CapA -10	MSTIHG	SVSLDAVSSTH	GT	PGFQTPDARVISRFGFN	
CapA Δ14-18	MVRLAKLLRSTI-----	SVSLDAVSSTH	GT	PGFQTPDARVISRFGFN	
Variante	Lassozeptid im Überstand		Lassozeptid im Zellpellet		
CapA -2	+		+		
CapA -3	-		+		
CapA -5	-		-		
CapA -10	-		-		
CapA Δ14-18	-		-		

Abbildung 4.23: Einfluss des Leaderpeptids auf die Produktion von Capistruin. Dargestellt sind die Sequenzen der untersuchten CapA-Varianten und der jeweilige Einfluss auf die Produktion und Lokalisation von Capistruin.

Desweiteren wurde eine interne Deletion der Aminosäuren His14-Gly18 durchgeführt, da diese Sequenz nach Sekundärstrukturvorhersagen mittels PSIPRED 2.6 [179] unstrukturiert vorliegen sollte. Interessanterweise konnte nur im Falle von CapA -2 und CapA -3 eine Konversion in Capistruin nachgewiesen werden, wobei bei CapA -3 das Lassozeptid lediglich im Zellpellet und nicht im Kulturüberstand detektiert werden konnte, was auf eine intrazelluläre Lokalisation schließen lässt. Alle weiteren Modifizierungen des Leaderpeptids führten zur Unterdrückung der Capistruinproduktion. Demzufolge scheinen minimale N-terminale Verkürzungen des Vorläufers drastischen Einfluss auf die Biosynthese des Lassozeptids zu haben.

4.1.10.8 Evaluierung des biokombinatorischen Potentials der Lassozeptidbiosynthese

Bisher sind mit dem *mcjABCD*-Gencluster, das für die Biosynthese von MccJ25 kodiert, und dem in dieser Arbeit beschriebenen *capABCD*-Gencluster zur Synthese von Capistruin zwei Lassozeptidbiosynthesegencluster bekannt. Mutationsstudien der jeweiligen Vorläuferproteine McjA und CapA haben gezeigt, dass die Biosynthesemaschinerien beider Lassoptide promisk sind, also eine Vielzahl von Lassozeptidvarianten synthetisieren können. Bei der Analyse des chemischen Verzweigungspunktes zeigte sich jedoch, dass weder Glu8 in MccJ25 noch Asp9 in Capistruin durch die jeweils andere saure Aminosäure ersetzt werden konnten, was auf eine hohe Spezifität der Seitenkettenaktivierung (vermutlich katalysiert durch McjC/CapC) hindeutet. Desweiteren sind bei MccJ25 weder Gly1 noch Gly2 durch eine andere proteinogene Aminosäure substituierbar und bei Capistruin stellen Gly1 und Thr-2 (Thr28 an der P2-Position der Proteaseschnittstelle) kritische Positionen dar. Unter der Annahme, dass Protein B für die proteolytische Spaltung des Vorläufers und Protein C für die Aktivierung der Seitenkettencarboxylgruppe verantwortlich sind, stellt sich die Frage, ob die Proteine beider Biosynthesecenter kombiniert werden können. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden zunächst zwei Hybridvorläufer mittels PCR generiert und in den pCDFDuet-Vektor kloniert. Der CapA-McjA Hybridvorläufer ist eine Translationsfusion des CapA-Leaderpeptids mit der Lassosequenz von McjA. Analog stellt der McjA-CapA_T2G Hybrid eine Fusion des Leaderpeptids von McjA und der Lassosequenz von CapA dar, bei der zur Berücksichtigung des kritischen Gly2-Rests für die MccJ25-Biosynthese eine T2G-Mutation eingebaut wurde (Abbildung 4.24).

	Leaderpeptid	Lassosequenz
McjA	MIKHFHFNKLSSGKKNVSPAKGVIQIKKSASQLTK	GGAGHVP-EYFVGIGTPISFYG
CapA	MVRLLAkLLRSTIHGSGVSLDAVSSTH	GTPGFQTPDARVISRFGFN
McjA-CapA T2G-Hybrid	MIKHFHFNKLSSGKKNVSPAKGVIQIKKSASQLTK	GGPGFQTPDARVISRFGFN
CapA-McjA-Hybrid	MVRLLAkLLRSTIHGSGVSLDAVSSTH	GGAGHVP-EYFVGIGTPISFYG

Abbildung 4.24: Design der Hybridvorläuferproteine. Gezeigt sind die Primärstrukturen der beiden nativen Lassozeptidvorläufer McjA und CapA, sowie die daraus abgeleiteten Hybridvorläuferproteine McjA-CapA T2G und CapA-McjA. Beide Hybride stellen jeweils eine Kombination aus Leaderpeptid und Lassosequenz der beiden nativen Vorläufer dar. Im Falle des McjA-CapA T2G wurde zusätzlich eine T2G-Mutation innerhalb der Lassosequenz eingefügt.

Der jeweilige Hybridvorläufer wurde mit den prozessierenden Enzymen und Exportern beider Systeme (BCD, jeweils auf einem Plasmid kodiert) exprimiert und mittels HPLC-MS auf eine Konversion *in vivo* hin untersucht (Tabelle 4.6). Zur Kontrolle, ob die Präsenz von drei Plasmiden die Lassozeptidproduktion generell behindert, wurde ein BCD-Cluster durch einen intakten Biosynthesecenter ersetzt. Es zeigte sich, dass die Hybridvorläufer nicht in die jeweiligen Lassoptide konvertiert werden konnten. Bei den Kontrollen war im Gegensatz dazu jeweils das Lassozeptid des intakten Genclusters nachweisbar. Demzufolge sind beispielsweise CapB und McjC nicht in der Lage den CapA-McjA Hybridvorläufer in bioaktives MccJ25 zu konvertieren.

Tabelle 4.6: Zusammenfassung der biokombinatorischen Experimente zur Lassopeptidbiosynthese aus den Hybridvorläuferproteinen.

Hybridvorläufer	CapBCD	McjBCD	CapABCD	McjABCD	Lassopeptid
McjA-CapA T2G	+	+	-	-	-
	+	-	-	+	MccJ25
	-	-	+	+	Capistruin, MccJ25
CapA-McjA	+	+	-	-	-
	-	+	+	-	Capistruin
	-	-	+	+	Capistruin, MccJ25

4.1.11 Homologe Produktion von Capistruinvarianten in *B. thailandensis* E264

Die heterologe Produktion von Capistruin und Capistruinvarianten konnte erfolgreich in *E. coli* etabliert werden, jedoch waren die Ausbeuten insbesondere der Derivate deutlich geringer im Vergleich zur Produktion des Wildtyps in *B. thailandensis* E264. Die niedrige Produktionsrate von 0.01 – 0.05 mg/L Kultur limitiert unter anderem detaillierte Bioaktivitätsstudien der synthetisierten Varianten. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde daher eine homologe Produktion in *B. thailandensis* E264 untersucht. Als *proof of principle* sollte eine plasmidkodierte CapA-Mutante parallel zum Wildtyp in *B. thailandensis* E264 exprimiert und bezüglich ihrer Reifung in die Capistruinvariante im Vergleich zum Wildtyp analysiert werden. Dazu wurde das *capA_F33A*-Gen, das die Produktion von Capistruin F5A erlaubt, in den Expressionsvektor pSCrhaB2 [150] kloniert. Anschließend wurde ein mit diesem Konstrukt transformierter *B. thailandensis* E264-Stamm unter optimalen Produktionsbedingungen für Capistruin (M20-Medium, 42 °C) fermentiert. Eine HPLC-MS Analyse des Kulturüberstands einer mit 0.2% Rhamnose induzierten Kultur zeigte die erfolgreiche Produktion von Capistruin F5A zusätzlich zum Wildtyp (Abbildung 4.25). Ein Vergleich der Produktionsraten mittels Peakintegration der EICs belegte, dass beide Lassopeptide in vergleichbaren Mengen hergestellt wurden. Damit ist das homologe Produktionssystem dem Heterologen in *E. coli* deutlich überlegen und sollte in Zukunft weitere Analysen der Capistruinvarianten im Hinblick auf Bioaktivität und Stabilität erleichtern.

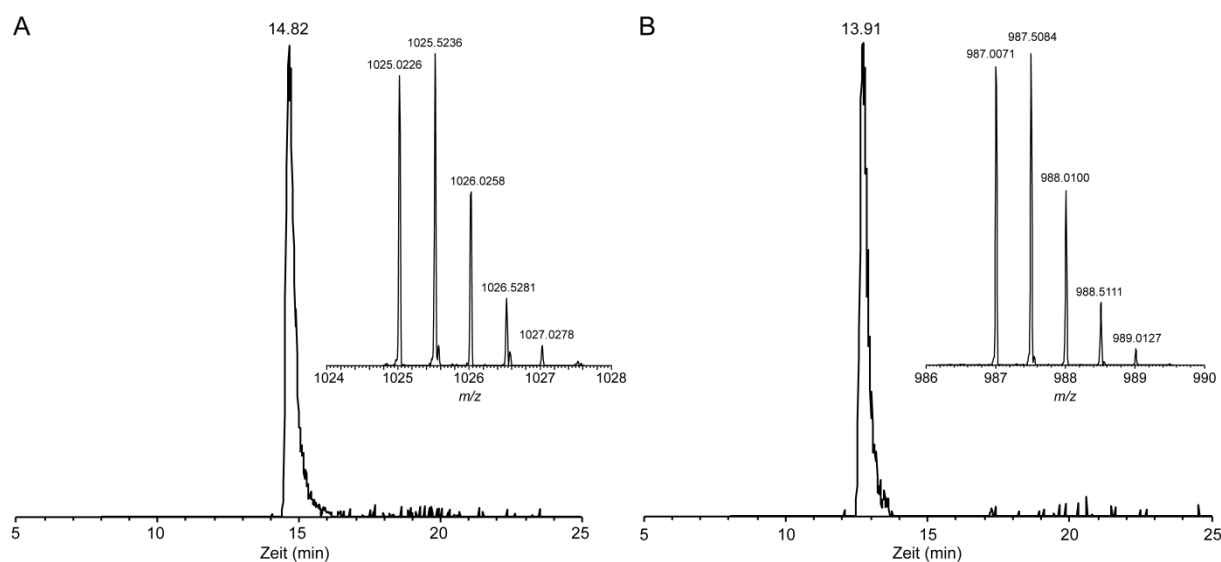


Abbildung 4.25: Homologe Produktion von Capistrin F5A. HPLC-MS-Analyse des Kulturüberstands von *B. thailandensis* E264, das mit pSCrhaB2_ capA F33A transformiert wurde. (A) EIC ($m/z = 1025.0 - 1025.1$) und das entsprechende ESI-FT-MS-Spektrum von Capistrin ($[M+2H]^{2+}_{\text{berechnet}} = 1025.0191$). (B) EIC ($m/z = 987.0 - 987.1$) und das entsprechende ESI-FT-MS-Spektrum der Capistrin F5A-Variante ($[M+2H]^{2+}_{\text{berechnet}} = 987.0038$).

4.2 Der Glucagonrezeptorantagonist BI-32169 ist ein lassostrukturiertes Peptid

Bei der Suche nach neuen Glucagonrezeptorantagonisten, die als vielversprechende Kandidaten einer Therapie gegen Diabetes gelten [180], wurde das bizyklische 19-AS Peptid BI-32169 entdeckt [121]. Das von *Streptomyces* sp. (DSM 14996) produzierte Peptid zeigte eine Inhibition des humanen Glucagonrezeptors mit einem IC_{50} -Wert von 440 nM. Seine Primärstruktur ist definiert durch einen N-terminalen Makrolaktamring aus 9 Aminosäuren, der durch eine Isopeptidbindung zwischen der α -NH₂-Gruppe des N-terminalen Gly1 und der Seitenkettencarboxylgruppe des Asp9 gebildet wird. Zusätzlich liegt eine Disulfidbrücke zwischen dem C-terminalen Cys19 und dem im Makrozyklus lokalisierten Cys6 vor, woraus eine bizyklische Struktur resultiert (Abbildung 4.26). Ein Vergleich mit den Primärstrukturen von Klasse I und Klasse II Lassozeptiden macht deutlich, dass BI-32169 eine Mischform aus beiden Klassen zu sein scheint, mit einem Gly an Position 1 und zwei Cysteinen, die eine Disulfidbindung ausbilden. Aufgrund der Ähnlichkeiten in der Primärstruktur und da Streptomyceten für die Produktion von Lassozeptiden beider Klassen bekannt waren, wurde postuliert, dass BI-32169 eine Lassostruktur besitzt. Diese Hypothese sollte anhand von massenspektrometrischen und NMR-spektroskopischen Untersuchungen bestätigt werden.

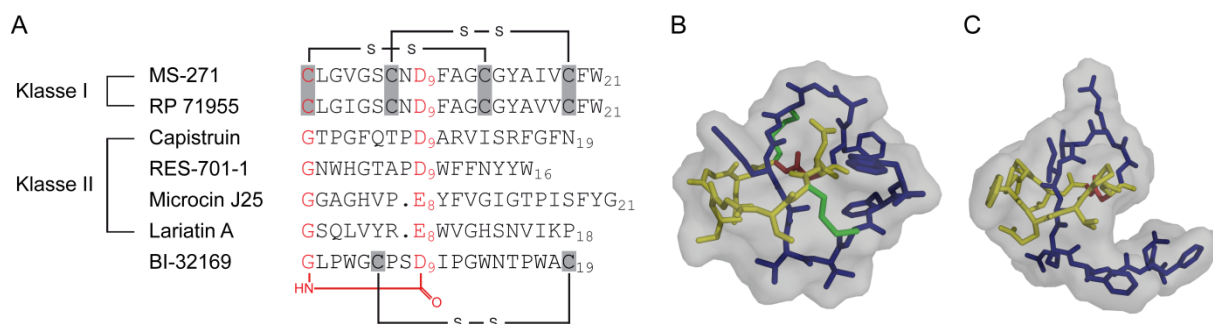


Abbildung 4.26: Lassoptide. (A) Primärstrukturen bisher bekannter Lassoptide im Vergleich mit dem Glucagonrezeptorantagonisten BI-32169. (B) NMR-Struktur des Klasse I-Lassopeptids RP 71955 (PDB 1RPB). (C) NMR-Struktur von Capistruin als Beispiel für Lassoptide der Klasse II.

4.2.1 Massenspektrometrische Analyse von BI-32169

Das bizyklische Peptid BI-32169 konnte nach Fermentation von *Streptomyces* sp. durch eine Methanolextraktion des Myceliums und anschließende Reinigung mittels präparativer RP-HPLC isoliert werden (Abbildung 4.27). Eine vollständige Reduktion des disulfidverbrückten Peptids war unter Zugabe von DTT in 50 mM Na₂HPO₄, 6 M GdmCl, pH 8.0 möglich (Abbildung 4.28).

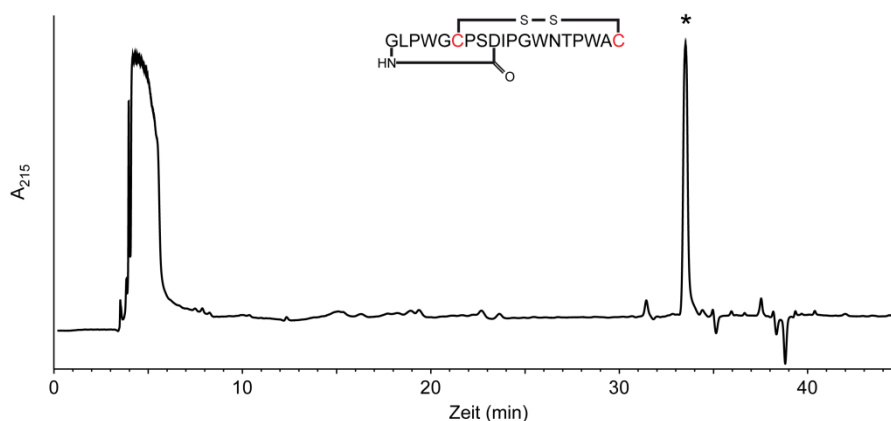


Abbildung 4.27: Reinigung von BI-32169 aus dem Mycelium. Gezeigt ist das Chromatogramm einer präparativen RP-HPLC-Reinigung von BI-32169 aus dem Methanol-Extrakt des Myceliums von *Streptomyces* sp. (DSM 14996) nach einer Kultivierung in BI-Medium bei 28 °C für 5 Tage. Der Naturstoff (*) zeigte eine Retentionszeit von 33.5 min.

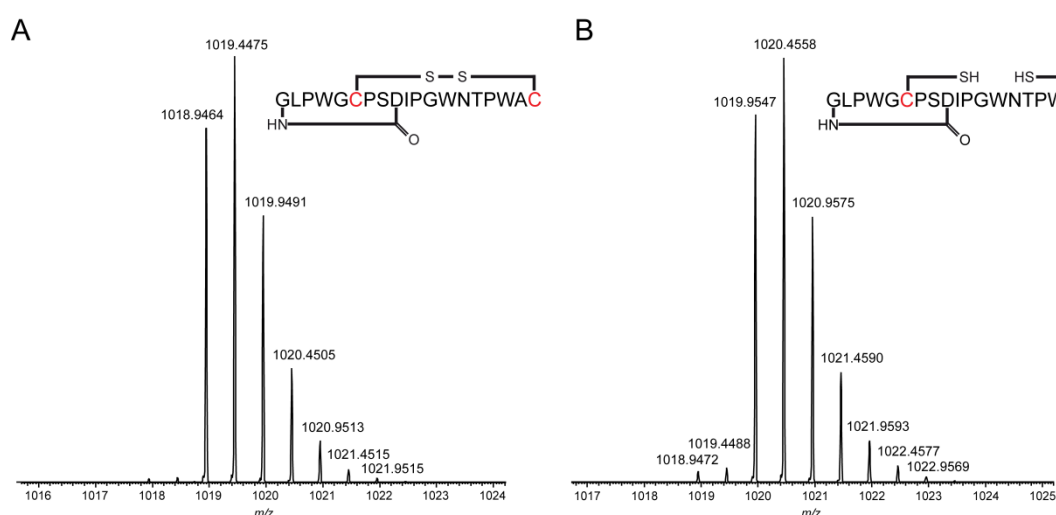


Abbildung 4.28: ESI-FT-Massenspektren von nativem (A) und reduziertem (B) BI-32169. (A) $[M + 2H]^{2+}_{\text{berechnet}} = 1018.9435$; $[M + 2H]^{2+}_{\text{beobachtet}} = 1018.9464$; Abweichung 2.8 ppm. (B) $[M + 2H]^{2+}_{\text{berechnet}} = 1019.9513$; $[M + 2H]^{2+}_{\text{beobachtet}} = 1019.9547$; Abweichung 3.3 ppm.

Um zu untersuchen, ob BI-32169 ein verzweigt-zyklisches Peptid ist, das durch die Ausbildung der Disulfidbindung zwischen Cys6 und Cys19 einen zusätzlichen Ring formt, oder eine Lassostruktur besitzt, wurden Fragmentierungsstudien der nativen und reduzierten Form durchgeführt. Wie bereits bei der MS-Analyse von Capistrin deutlich wurde, zeigen Lasso-peptide aufgrund ihrer kompakten, rigiden Struktur ein schwaches Fragmentierungsverhalten, während bei verzweigt-zyklischen Peptiden der exozyklische, lineare Teil in der Regel Fragmentationen in hohen Ausbeuten ergibt. Bei der Tandem-MS-Analyse der m/z 1019.5 zweifach protonierten Spezies von nativem BI-32169 wurde ein schwaches Fragmentierungsverhalten beobachtet (Abbildung 4.29). Die intensivsten Fragmentationen resultierten aus einem Verlust von Ile10, Ile10 und H_2O , sowie dem Verlust von Neutralkomplexen (H_2O und CO). Die verbleibenden Fragmentationen gingen aus mindestens drei Serien von zweifachen Peptidbindungsbrüchen hervor. Die dominierende Serie resultierte aus einem Peptidbindungsbruch N-terminal von Pro11 in Kombination mit C-terminal lokalisierten Bindungsbrüchen und führte zur Bildung von linearen Peptidfragmenten mit einer Länge von 3 bis 8

Aminosäuren (z.B. $[P_{11}GW_{13}]^+$ und $[P_{11}GWNTPW_{18}]^+$) sowie verzweigt-zyklischen Fragmenten, die weiterhin die Disulfidbrücke enthielten. Außerdem wurden zwei weitere Serien mit Fragmentationen niedriger Intensität beobachtet, die aus Peptidbindungsbrüchen N-terminal von Ile10 bzw. C-terminal von Trp17 in Kombination mit einem zusätzlichen C- bzw. N-terminalem Bindungsbruch hervorgingen. Abschließend kann festgehalten werden, dass aufgrund der bizyklischen Struktur von nativem BI-32169 zwei Peptidbindungen brechen müssen, um Fragmentationen zu beobachten. Das Fragmentierungsspektrum zeigte, dass die Peptidbindungen zwischen D_9 -I₁₀, I₁₀-P₁₁ und W_{17} -A₁₈ die höchste Anfälligkeit für Bindungsbrüche aufwiesen, wohingegen die Disulfidbrücke unter den gewählten Fragmentierungsbedingungen stabil war. Basierend auf den MS²-Studien des nativen Peptids war es jedoch nicht möglich zwischen einer bizyklischen und einer Lassostruktur zu diskriminieren, da das beobachtete schwache Fragmentierungsverhalten nicht nur in der postulierten Lassostruktur, sondern auch in den notwendigen zweifachen Peptidbindungsbrüchen begründet liegen könnte.

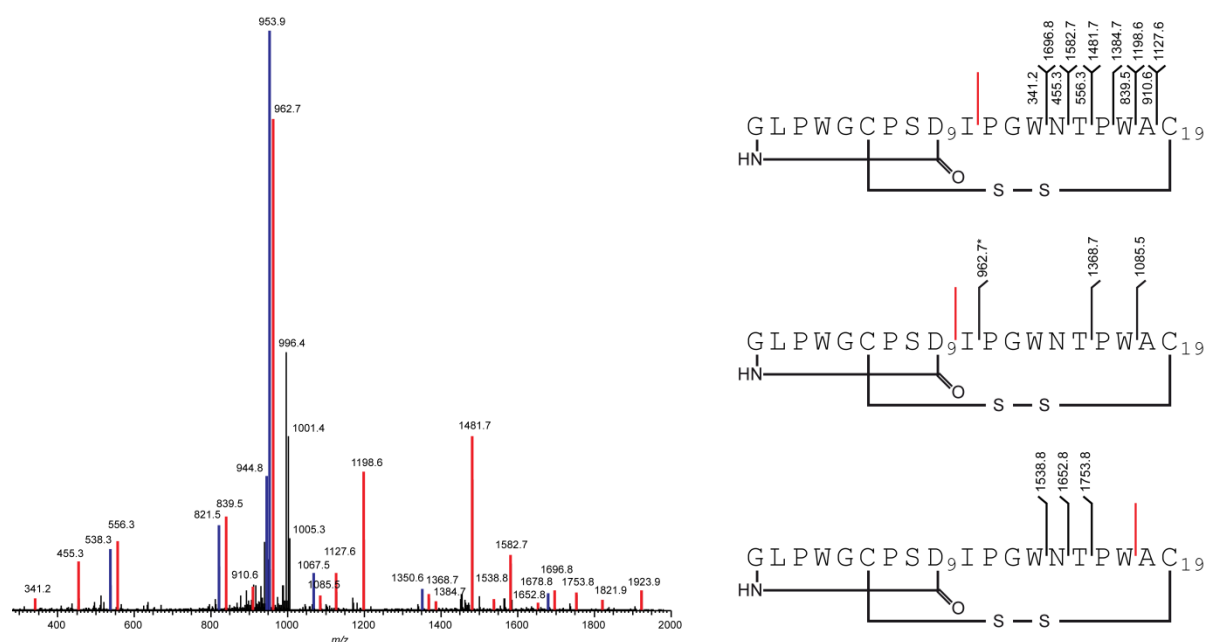


Abbildung 4.29: Fragmentierungsstudien mittels Tandem-Massenspektrometrie von nativem BI-32169.

Dargestellt ist das MS²-Spektrum der m/z 1019.5 zweifach protonierten Form von nativem BI-32169. Die rot markierten Peaks entsprechen den schematisch gezeigten Fragmentationen. Die blau dargestellten Peaks repräsentieren Ionen, die aus einem zusätzlichen Wasserverlust der roten Fragmentationen hervorgehen. Alle beobachteten Fragmente sind das Resultat zweier Peptidbindungsbrüche, die innerhalb der Schemata als rote und schwarze Linie gezeigt sind. Aus den zwei Bindungsbrüchen gehen ein lineares und ein verzweigt-zyklisches Fragment hervor. Zweifach geladene Fragmentationen sind mit einem Stern markiert.

Daher wurden Fragmentierungsstudien der m/z 1020.5 zweifach protonierten Spezies von reduziertem BI-32169 durchgeführt. Die reduzierte Form zeigte ebenfalls eine schwache Fragmentierungstendenz, aber das MS²-Spektrum unterschied sich deutlich von dem des nativen Peptids (Abbildung 4.30). Alle detektierten Fragmentationen hatten ihren Ursprung in einzelnen Peptidbindungsbrüchen innerhalb des C-terminalen Schwanzes. Die einzige Ausnahme bildete das

Ion mit dem m/z -Verhältnis von 839.6, das dem internen Fragmentation [PGWNTPW]⁺ entspricht. Es wurden mit Ausnahme der Fragmente, die aus C-terminalen Bindungsbrüchen von Pro11 und Pro16 hervorgehen würden, alle b und/oder y-Ionen beobachtet, die aus einzelnen Bindungsbrüchen im linearen C-Terminus resultieren. Das intensivste Fragmentation mit einem m/z -Verhältnis von 959.9 ging aus dem Bruch der C-terminalen Peptidbindung zwischen Ala18 und Cys19 hervor. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Intensitäten der Fragmentationen niedriger sind, als für ein verzweigt-zyklisches Peptid zu erwarten wäre. Eine definitive Beurteilung, ob BI-32169 wirklich die postulierte Lassostruktur besitzt, ist jedoch nur mittels NMR-Strukturaufklärung möglich.

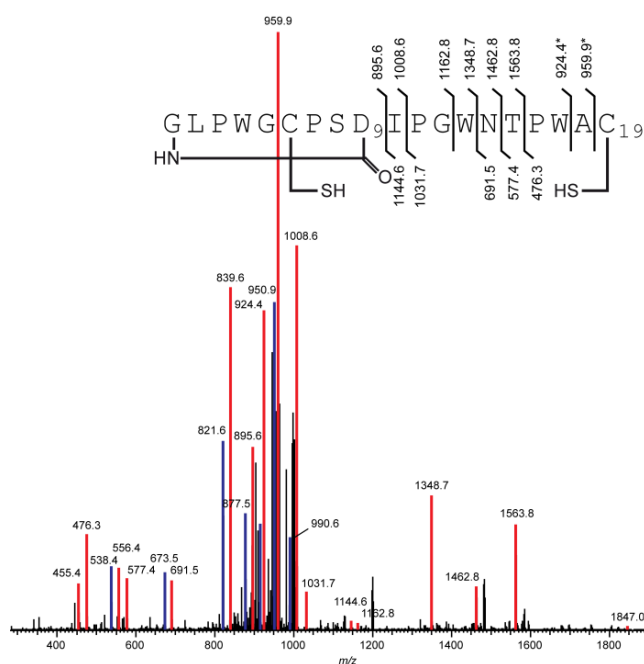


Abbildung 4.30: Fragmentierungsanalyse von reduziertem BI-32169. MS²-Spektrum der m/z 1020.5 zweifach protonierten Spezies von reduziertem BI-32169. Rot markierte Peaks entsprechen den schematisch dargestellten b- und y-Fragmentationen. Aus einem zusätzlichen Wasserverlust resultierende Fragmente sind blau markiert. Zweifach geladene Fragmentationen sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Um zu untersuchen, ob reduziert BI-32169 wieder in die native Form reoxidiert werden kann, wurde es einer Oxidation durch Exposition gegenüber Luftsauerstoff unterzogen. Dabei zeigte das reoxidierte Peptid in einer HPLC-MS-Analyse die gleiche Retentionszeit und ein identisches MS²-Spektrum im Vergleich zum Naturstoff (Abbildung 4.31). Folglich kann durch sequentielle Reduktion/Reoxidation natives BI-32169 regeneriert werden. Des Weiteren führte ein Erhitzen des reduzierten BI-32169 in 6 M GdmCl auf 95 °C weder zu Veränderungen in der Retentionszeit noch im Fragmentierungsverhalten. Interessanterweise führte eine Inkubation von reduziertem BI-32169 mit Carboxypeptidase Y zu einem vollständigen Abbau des linearen C-Terminus unter Bildung des Makrolaktamrings. Dagegen war BI-32169 aufgrund der Disulfidbrücke zwischen Cys6 und Cys19 erwartungsgemäß stabil gegenüber proteolytischer Hydrolyse durch die Exoprotease.

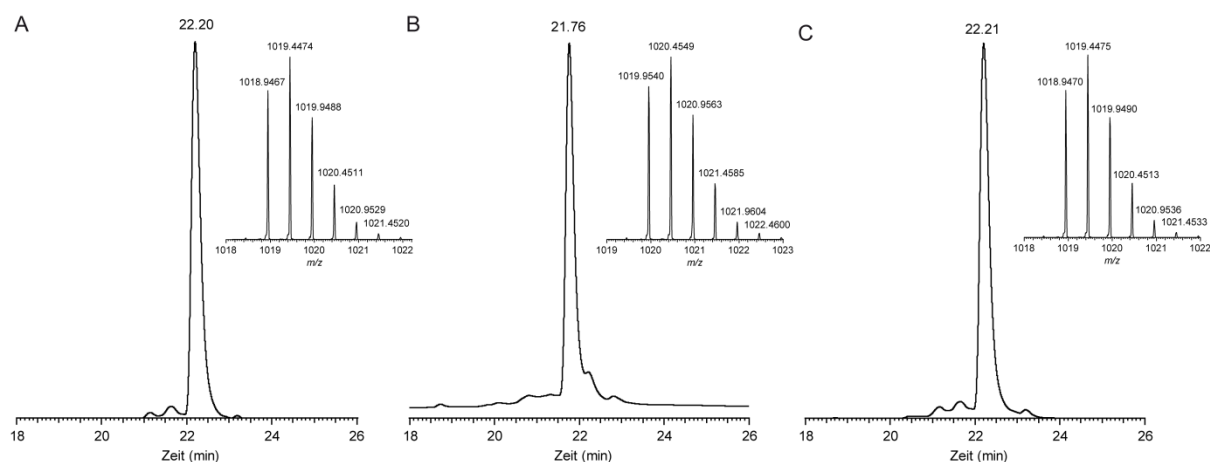


Abbildung 4.31: HPLC-MS-Analytik des nativen (A), reduzierten (B) und reoxidierten (C) BI-32169. Gezeigt sind die UV-Chromatogramme (A_{215}) und die entsprechenden ESI-FT-MS-Spektren.

4.2.2 NMR-spektroskopische Strukturaufklärung von BI-32169

Anhand der Fragmentierungsstudien des nativen und reduzierten BI-32169 konnte die postulierte Lassostruktur nicht eindeutig bewiesen werden. Um die Hypothese endgültig zu verifizieren oder zu widerlegen, wurde daher die Struktur von nativem BI-32169 mittels NMR-Spektroskopie näher charakterisiert. Es wurden zunächst ^1H -Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen, wobei die beste Auflösung bei 313 K erzielt wurde. Demzufolge wurden alle weiteren 2D-Experimente bei dieser Temperatur durchgeführt. Anhand der DQF-COSY-, TOCSY- und NOESY-Spektren wurde eine vollständige Zuordnung der ^1H -Signale vorgenommen.

BI-32169 besitzt bei einer Länge von 19 Aminosäuren vier Proline, die alle in der trans-Konformation vorliegen, da starke sequentielle $\text{H}\alpha_i\text{-H}\delta_{i+1}$ NOE-Kontakte beobachtet wurden. Starke NOE-Signale zwischen dem NH von Gly1 und den Seitenkettenprotonen von Asp9 bewiesen zudem die intramolekulare Isopeptidbindung. Das Vorliegen der Disulfidbrücke wurde durch NOE-Kontakte zwischen Cys6 und Cys19 verifiziert. Zusätzlich wurden weitreichende NOEs zwischen Gly1 und Trp13, Leu2 und Trp13, Leu2 und Asn14, Pro3 und Trp13, Gly5 und Thr15, Gly5 und Pro16, Cys6 und Thr15, Pro7 und Asn14, Ser8 und Thr15, Asp9 und Asn14, Asp9 und Thr15 detektiert. Diese weitreichenden NOEs deuten auf ein Hindurchfädeln des C-terminalen Schwanzes durch den 9-AS Makrolaktamring hin.

Die anschließenden Strukturberechnungen wurden auf der Basis von 154 Distanzbeschränkungen durchgeführt, wovon sich 36 auf das Peptidrückgrat und 68 auf die Seitenketten bezogen sowie 50 weitreichender Natur waren (Tabelle 4.7). Die Isopeptidbindung wurde analog zur Strukturbestimmung des Capistruins durch Einfügen einer 1.33 \AA Distanzbeschränkung zwischen dem Stickstoff von Gly1 und dem C γ -Atom von Asp9 realisiert. Insgesamt wurden 8.1 Distanzbeschränkungen pro Aminosäurerest für die Strukturberechnung eingesetzt. Details zu den verwendeten Torsionswinkelbeschränkungen sind in Abschnitt 3.6.2.1 beschrieben.

Tabelle 4.7: Strukturelle Statistik der Familie von 15 Niedrigenergie-Strukturen von nativem BI-32169.

NMR-Beschränkungen	Verletzungen der NMR-Beschränkungen
Total: 154	Distanzverletzungen, $>0.5 \text{ \AA}$: 0;
Distanz, $i=j$: 47	Standardabweichung: 0.025 \AA
Distanz, $ i-j =1$: 57	Diederwinkelverletzungen, $>5^\circ$: 0
Distanz, $ i-j >1$: 50	Standardabweichung: 2.4°
Diederwinkel: 24	Durchschnittliche paarweise Standardabweichung (Leu2-Ala18)
H-Brücke: 0	Rückgratatom: 0.04 \AA
Beschränkungen/AS-Rest: 9.4	Alle Atome (ausgenommen H): 0.07 \AA

Die Strukturberechnung wurde mit 50 Zufallskonformeren gestartet. Eine Familie von 15 Strukturen wurde ausgewählt, wobei minimale Energie und minimale Verstöße gegen die experimentellen Distanzbeschränkungen als Kriterien zur Auswahl dienten. Diese 15 Strukturen zeigen eine Standardabweichung (rmsd) für das Peptidrückgrat von 0.04 \AA und keiner der Aminosäurereste befindet sich in einer nichterlaubten Region des Ramachandran-Plots. Die 15 Niedrigenergie-Konformere repräsentieren die Lösungsstruktur von BI-32169 und beweisen zweifelsfrei die postulierte Lassostruktur (Abbildung 4.31).

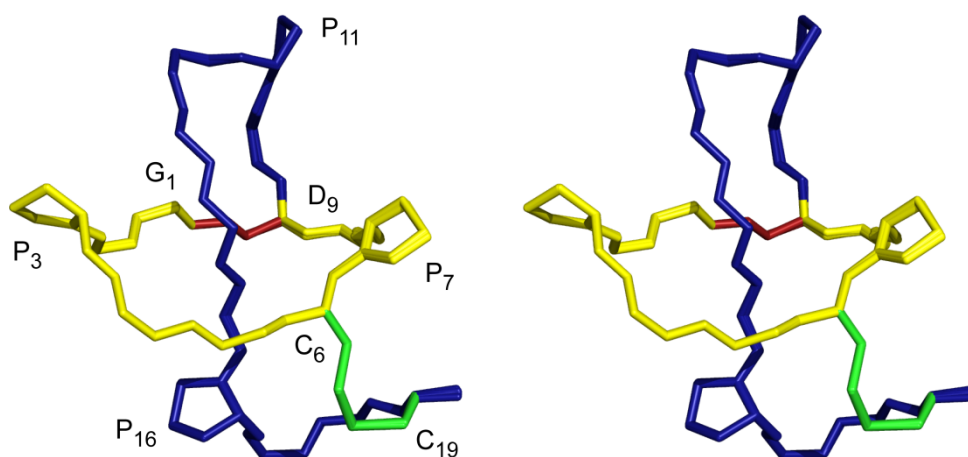


Abbildung 4.31: NMR-Struktur von BI-32169 in Lösung. Stereodarstellung der Strukturüberlagerung von 15 Niedrigenergie-Strukturen. Die Strukturen sind über alle Atome des Peptidrückgrats überlagert. Die Isopeptidbindung (rot) zwischen der α -NH₂ Gruppe des Gly1 und der Seitenkettencarboxylgruppe des Asp9 führt zur Bildung des 9-AS Makrolaktamrings (gelb), durch den der lineare C-terminale Schwanz (blau) hindurch gefädelt ist. Die Disulfidbrücke (grün) zwischen Cys6 und Cys19 bindet den hindurch gefädelt C-Terminus kovalent an den Makrolaktamring.

Der aus 10 Aminosäuren bestehende C-terminale Schwanz ist durch den 9-AS N-terminalen Makrolaktamring hindurch gefädelt, wobei Ile10-Asn14 oberhalb und Thr15-Cys19 unterhalb der Ebene des Makrozyklus positioniert sind. Die Disulfidbindung zwischen Cys6 und Cys19 bindet den hindurch gefädelt C-terminalen Schwanz kovalent auf der gegenüberliegenden Seite des Rings und führt damit zur Bildung eines sehr rigiden Peptidgerüsts, das strukturell einem Notenschlüssel ähnelt. Die beiden Prolinreste Pro11 und Pro16 führen zwei Knicke in das Rückgrat des C-Terminus ein, woraus eine verdrehte S-Struktur resultiert und die beiden Cysteinreste in unmittelbare

Nachbarschaft bringt. Dabei stellt der erste Knick, der die Reste Ile10-Trp13 umfasst, eine β -Schleife der Klasse I dar.

Die Gesamtstruktur von BI-32169 ist globulär (Abbildung 4.32) und ein Großteil der Amidprotonen ist innerhalb der kompakten Lassostruktur verborgen, was gut mit den beobachteten niedrigen Temperaturkoeffizienten übereinstimmt. Thr15 zeigte einen Temperaturkoeffizienten von beinahe Null, was zuvor für Ser14 im Capistruin beobachtet worden war, und mit der Lokalisierung der Peptidbindung zwischen Asn14 und Thr15 innerhalb des Makrozyklus zu erklären ist. Zur Stabilisierung der Lassostruktur tragen hauptsächlich van-der-Waals Wechselwirkungen der nahezu ausschließlich hydrophoben Aminosäuren bei. Eine zusätzliche Stabilisierung über Salzbrücken ist auszuschließen, da das Peptid lediglich über den negativ geladenen C-Terminus als Ladungsträger verfügt.

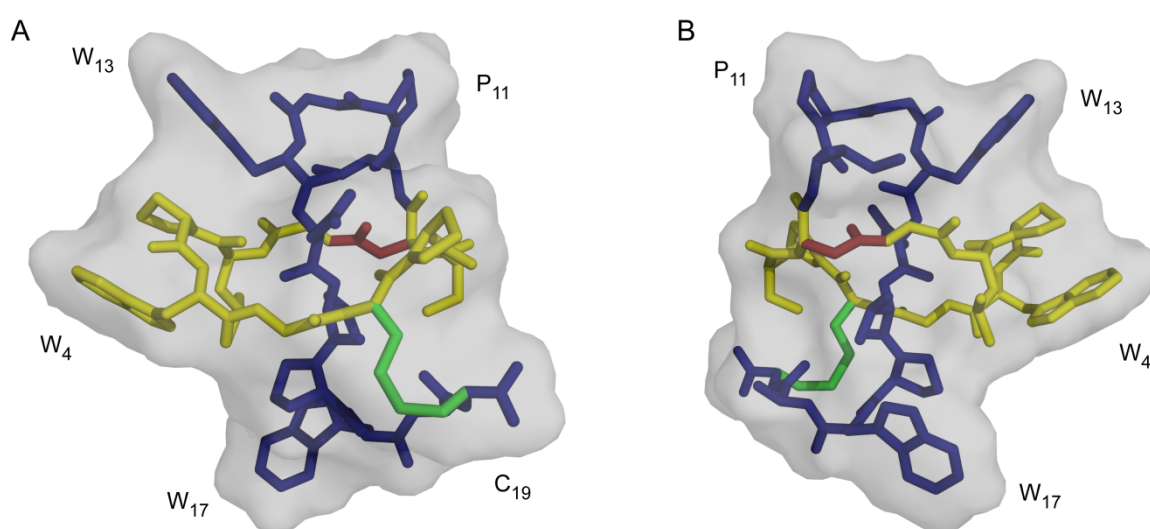


Abbildung 4.32: Strukturelle Einblicke in BI-32169. (A) Gesamtstruktur von BI-32169. Die lösungsmittelzugängliche Oberfläche ist in transparentem grau gezeigt. Die Isopeptidbindung (rot) zwischen Gly1 und Asp9 schließt den 9-AS Makrolaktamring (gelb), durch den der exozyklische, lineare C-Terminus (blau) hindurch gefädelt ist. Die Disulfidbrücke zwischen Cys6 und Cys19 ist in grün dargestellt. (B) Abgeleitet aus (A) durch eine 180°-Drehung um die y-Achse.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass durch massenspektrometrische und NMR-spektroskopische Studien die postulierte Lassostruktur belegt werden konnte. Bei BI-32169 handelt es sich dabei um ein Lassopeptid, das keiner der bisher bekannten Klassen zugeordnet werden kann und aufgrund seiner interessanten biologischen Aktivität in Kombination mit der sehr rigiden Struktur ein vielversprechendes Peptidgerüst zur Aktivitätsoptimierung und Funktionsdiversifizierung mittels Protein Engineering darstellt.

4.3 Anantin – ein weiterer Vertreter der Klasse II-Lasso peptide?

Bei Anantin handelt es sich um ein bereits 1991 isoliertes Peptid, das sich durch seine antagonistische Wirkung gegenüber dem atrialen natriuretischen Faktor (ANF) auszeichnet [117,118]. Es besitzt eine Dissoziationskonstante für die Bindung an den ANF-Rezeptor von 0.61 μM und wird von *Streptomyces coeruleus* DSM 4777 bzw. 4778 sekretiert. Anantin besteht aus 17 proteinogenen Aminosäuren und besitzt eine verzweigt-zyklische Primärstruktur (Abbildung 4.33). Dabei wird der zyklische Teil durch eine Amidbindung zwischen der $\alpha\text{-NH}_2$ -Gruppe des Gly1 und der β -Carboxylgruppe von Asp8 unter Bildung eines 8-AS Makrolaktamrings generiert. Da diese Struktur eine große Ähnlichkeit mit der Primärstruktur von Lasso peptiden der Klasse II zeigt, wurde für Anantin eine Lassostruktur postuliert.

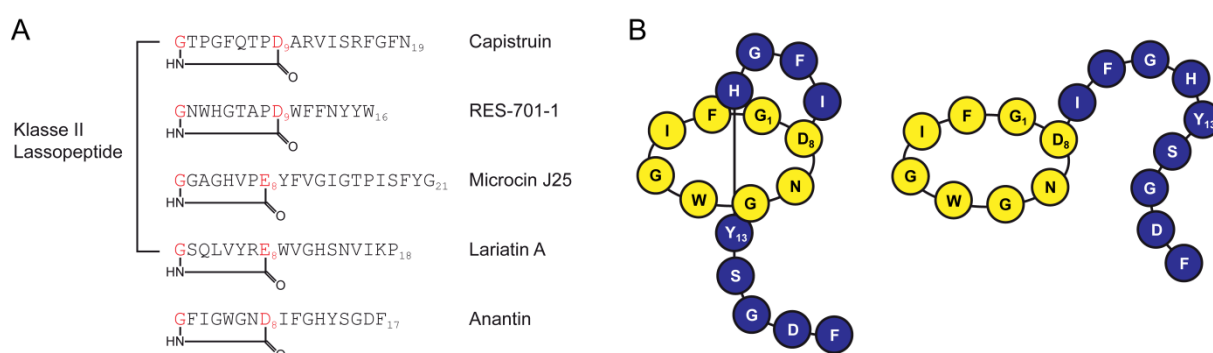


Abbildung 4.33: Der ANF-Antagonist Anantin. (A) Primärstruktur von Anantin im Vergleich mit den bekannten Lasso peptiden der Klasse II. (B) Schematische Darstellung der möglichen Topologien des C-terminalen Schwanzes (blau) in Relation zum Makrolaktamring (gelb).

4.3.1 Massenspektrometrische Untersuchungen von Anantin

Um diese Lassostrukturhypothese näher zu untersuchen, wurde *Streptomyces coeruleus* (DSM 4778) in SM-Medium fermentiert und Anantin mit Hilfe einer Methanolextraktion des Myceliums und anschließender präparativer RP-HPLC gereinigt. Tandem-massenspektrometrische Studien des m/z 936 zweifach protonierten Vorläuferions von Anantin zeigten ein schwaches Fragmentierungsverhalten, wobei das dominierende Tochterion (m/z 853.9) aus dem Peptidbindungsbruch zwischen Asp16 und Phe17 hervorging (Abbildung 4.34). Im Gegensatz zum MS^2 -Spektrum von Capistruin wurden b- und/oder y-Fragmentationen für jeden Peptidbindungsbruch innerhalb des linearen C-Terminus beobachtet. Dabei zeigten die Fragmentationen, die aus dem Peptidbindungsbruch zwischen His12 und Tyr13 generiert wurden, die geringste Intensität.

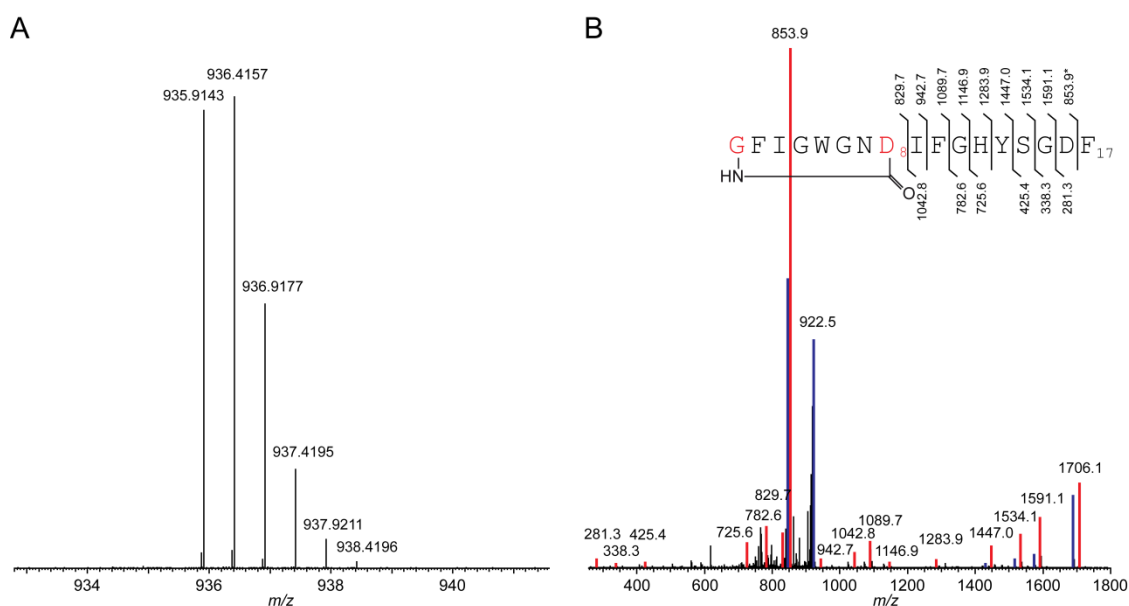


Abbildung 4.34: Massenspektrometrische Charakterisierung von Anantin. (A) ESI-FT-MS-Spektrum von Anantin. $[M + 2H]^{2+}_{\text{berechnet}} = 935.9147$; $[M + 2H]^{2+}_{\text{beobachtet}} = 935.9143$; Abweichung 0.4 ppm. (B) MS^2 -Spektrum der m/z 936 zweifach protonierten Form von Anantin. Rot markierte Peaks entsprechen den schematisch dargestellten b- und y-Fragmentionen, wohingegen blau markierte Peaks aus einem zusätzlichen Wasserverlust hervorgingen. Zweifach geladene Fragmentionen sind mit einem Stern markiert.

Neben der Fragmentierungsanalyse wurde Anantin einem Proteaseverdau mit Carboxypeptidase Y unterzogen, um zusätzliche Strukturinformationen anhand der Proteaselabilität zu gewinnen. Im Falle des Capistruins war die Exoprotease lediglich in der Lage das C-terminale Asn19 abzuspalten, der C-terminale Abbau stoppte also bei Capistruin ΔN . Bei Anantin führte die Inkubation mit Carboxypeptidase Y ebenfalls nur zur Abspaltung der C-terminalen Aminosäure (Phe17). Der Verdau lieferte unabhängig von der eingesetzten Proteasekonzentration und Inkubationszeit das 16-AS Peptid.

Unter Berücksichtigung des schwachen Fragmentierungsverhaltens und der Stabilität gegenüber Exoproteasen, kann von einer Lassostruktur des Anantins ausgegangen werden.

4.4 Lasso peptide als stabile Peptidgerüste – Entwicklung eines Integrininhibitors

Lasso peptide zeichnen sich aufgrund ihrer einzigartigen Struktur durch eine hohe Stabilität gegenüber Proteasen, Temperatur und chaotropen Reagenzien aus [36,126,181]. Desweiteren haben Mutagenesestudien zur Reifung von MccJ25 [146] und Capistruin [182] gezeigt, dass die Biosynthesemaschinerie promisk ist. Derivate beider Lasso peptide können durch Mutagenese der Vorläufergene *in vivo* produziert und fermentativ gewonnen werden. Diese Kombination aus Stabilität und hohem Derivatisierungspotential macht Lasso peptide zu idealen Kandidaten für Protein Engineering Ansätze. Bei dem Konzept des sogenannten „Epitop-Grafting“ werden pharmakologisch aktive Peptidsequenzen in stabile Peptidgerüste eingefügt und dadurch neue biologische Funktionen generiert. Um zu evaluieren, ob Lasso peptide im Rahmen dieses Konzeptes als molekulare Plattform verwendet werden können, wurde als *proof of principle* die Peptidsequenz Arg-Gly-Asp (RGD) als pharmakologisch aktives Epitop gewählt, das in die Lassostruktur integriert werden sollte. Die RGD-Sequenz ist als Bindungsmotiv von Integrinen bekannt [183], die eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion und Signalübertragung in der Zelle spielen und bei einer Vielzahl von pathologischen Prozessen wie Entzündungen, Thrombose oder Tumorangiogenese involviert sind [184,185]. Ein Beispiel für ein RGD-präsentierendes Peptid stellt das von der Arbeitsgruppe um Prof. Horst Kessler (Technische Universität München) entwickelte zyklische Pentapeptid Cilengitid (c[-RGDf(NMe)V-]) dar [163], das eine sehr hohe Affinität für das $\alpha_v\beta_3$ Integrin besitzt ($IC_{50} = 0.6$ nM) und sich momentan bei Merck KGaA in klinischen Studien als Angiogenesehemmer gegen Glioblastome befindet (Abbildung 4.35).

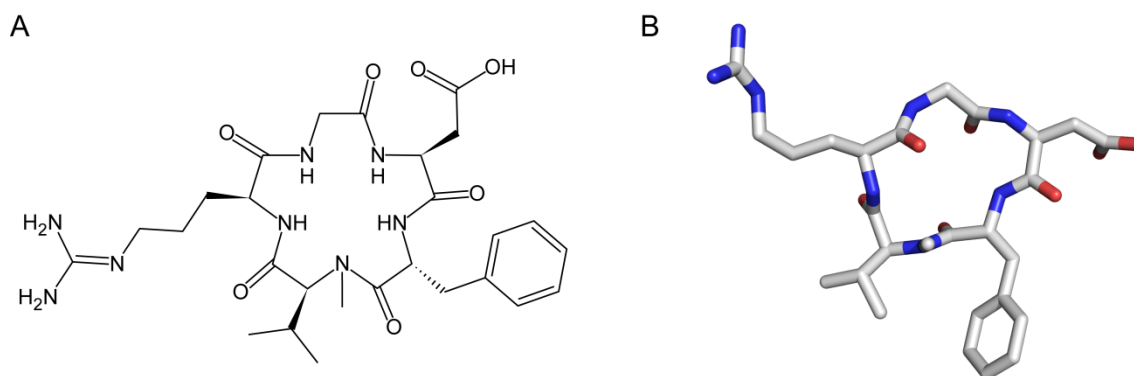


Abbildung 4.35: Das zyklische Pentapeptid Cilengitid (c[-RGDf(NMe)V-]). (A) Chemische Strukturformel. (B) Dreidimensionale Struktur bei der Bindung an das $\alpha_v\beta_3$ Integrin (PDB 1L5G).

Neben der Frage nach dem zu insertierenden Epitop ist die Position des Einbaus entscheidend. Innerhalb des Cilengitids wird die RGD-Sequenz aufgrund des 5-AS-Rings in Form eines Knicks mit Glycin im Zentrum präsentiert. Diese Geometrie erinnert an die Schleifenmotive in MccJ25 und Capistruin, weshalb die RGD-Sequenz an dieser Stelle in das Peptidgerüst eingebaut werden sollte. Eine dortige Insertion ermöglicht eine zum Cilengitid ähnliche Präsentation der pharmakologisch aktiven Sequenz. Darüber hinaus ist diese Position stark exponiert, was eine Bindung an das biologische Zielmolekül ohne sterische Hinderung erlauben sollte.

4.4.1 Einbau und Produktion der RGD-Lasso-peptidvarianten

Die RGD-Sequenz wurde mittels ortsgerichteter Mutagenese in die Lassosequenz der Vorläuferproteine CapA und McjA unter Verwendung der pCDFDuet_*capA*- und pTUC202-Vektoren als Template eingefügt. Im Falle des Capistruins wurden Arg11 und Val12 durch RGD substituiert, während bei Microcin J25 Gly12, Ile13 und Gly14 ersetzt wurden (Abbildung 4.36).

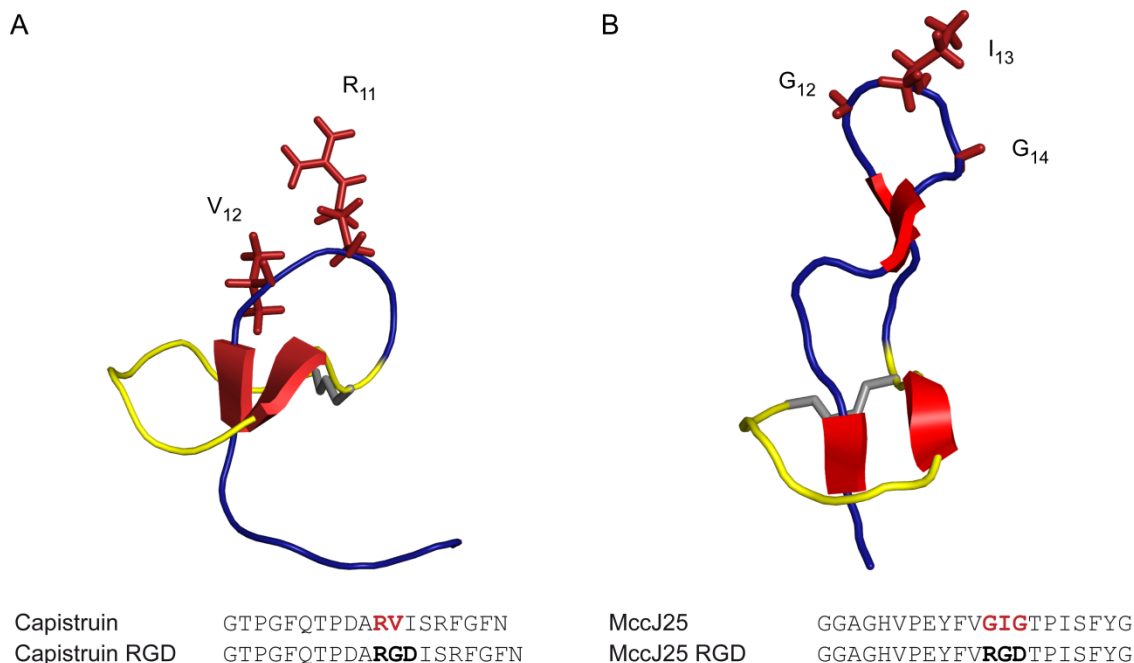


Abbildung 4.36: Position des Einbaus des RGD-Epitops innerhalb des stabilen Peptidgerüsts von Capistruin (A) und MccJ25 (B). (A) NMR-Struktur (BMRB 20014) und Sequenz von Capistruin. Die Aminosäuren Arg11-Val12 innerhalb der Schleife wurden durch das Integrinbindungsmotiv RGD substituiert. (B) NMR-Struktur (PDB 1Q71) und Sequenz von MccJ25. Die Aminosäuren Gly12-Gly14 in der β -Haarnadelstruktur wurden durch das RGD-Motiv ersetzt.

Die Produktion von Capistruin RGD wurde analog zu den Mutationsstudien in Abschnitt 4.1.10 analysiert. Dabei konnte keine Reifung der RGD-Vorläufervariante durch die prozessierenden Enzyme in die Lassostruktur nachgewiesen werden. Dieses Resultat steht in Einklang mit den Ergebnissen der Mutagenesestudien, in denen das β -Schleifenmotiv als kritisch für die Capistruinproduktion identifiziert wurde und folglich derartig signifikante Veränderungen von der Biosynthesemaschinerie nicht toleriert werden.

Zur Analyse der Produktion von MccJ25 wurde das pTUC202_RGD-Plasmid in *E. coli* DH5 α transformiert und der transformierte Stamm in M63-Medium bis zum Erreichen der stationären Phase bei 37 °C fermentiert, wie es für eine optimale Produktion von MccJ25 in der Literatur beschrieben wurde [156]. Die HPLC-MS-Analytik des Kulturüberstands bestätigte die erfolgreiche Synthese der MccJ25 RGD-Variante, da eine zweifach protonierte Verbindung mit dem berechneten m/z -Verhältnis nachgewiesen werden konnte. Eine Produktion des Wildtyps war erwartungsgemäß nicht mehr zu beobachten. Die Variante wurde daraufhin im 5 L-Maßstab

fermentiert und mittels präparativer RP-HPLC mit einer Ausbeute von 0.5 mg/L Kultur zur Homogenität gereinigt (Abbildung 4.37).

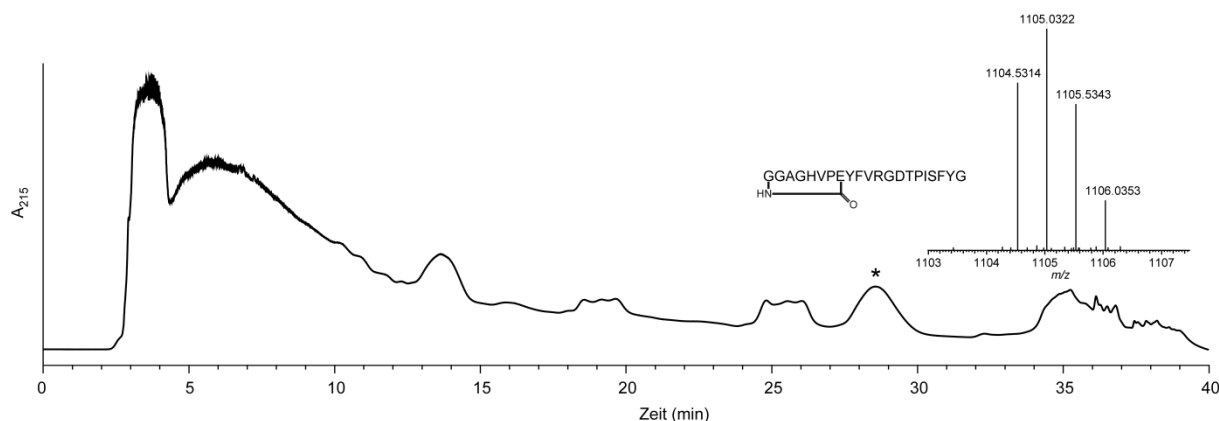


Abbildung 4.37: Reinigung von MccJ25 RGD. Gezeigt ist das UV-Chromatogramm (A_{215}) einer präparativen RP-HPLC-Reinigung von MccJ25 RGD aus dem XAD16-Extrakt des Kulturüberstands eines *E. coli* DH5 α [pTUC202_RGD]–Stamms, der in M63-Medium bei 37 °C für 24 h inkubiert wurde. Die MccJ25-Variante (*) zeigte eine Retentionszeit von 28.7 min. Das ESI-FT-MS-Spektrum stimmte mit dem berechneten m/z -Verhältnis überein ($[M + 2H]^{2+}_{\text{berechnet}} = 1104.5298$; $[M + 2H]^{2+}_{\text{beobachtet}} = 1104.5314$; Abweichung 1.4 ppm).

4.4.2 Massenspektrometrische Untersuchungen von MccJ25 RGD – Nachweis der Lassostruktur

Um zu untersuchen, ob MccJ25 RGD in einer Lassostruktur vorliegt, wurde die Variante mittels Tandem-Massenspektrometrie charakterisiert und mit dem Fragmentierungsverhalten des Wildtyps verglichen. Das MS^2 -Spektrum von MccJ25 (Abbildung 4.38) zeigte neben den b- und y-Fragmentationen (Tabelle 4.8), die aus Peptidbindungsbrüchen innerhalb des 13-AS C-Terminus hervorgingen, die bereits beschriebenen charakteristischen binären Peptidkomplexfragmente, die aus sterisch verknüpften b- und y-Fragmentationen bestehen [109]. Als Beispiel für solch ein binäres Peptidkomplexfragment ist in Abbildung 4.38 das sterisch verknüpfte $b_{13}+y_4$ -Fragmentation (m/z 1739.2) gezeigt. Die Bildung dieser komplexen Fragmente ist charakteristisch für die Lassostruktur von MccJ25 und resultiert direkt aus der stabilen Verankerung des C-Terminus durch Phe19 und Tyr20, die auf gegenüberliegenden Seiten des Makrolaktamrings positioniert sind.

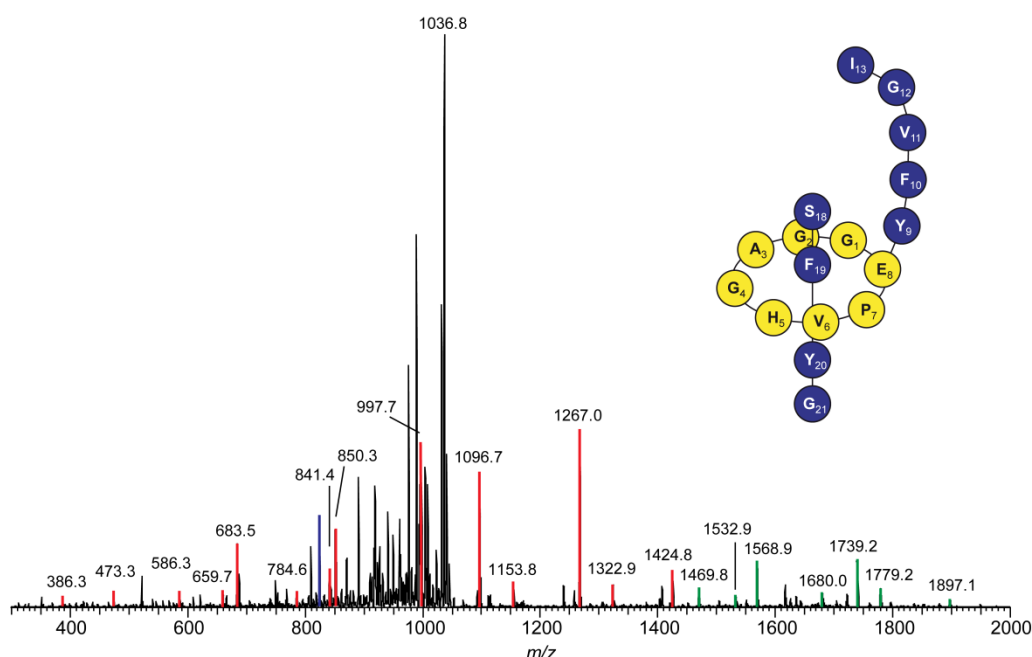


Abbildung 4.38: Fragmentierungsanalyse von MccJ25. MS²-Spektrum der m/z 1054 zweifach protonierten Form von MccJ25. Rot markierte Peaks entsprechen den in Tabelle 4.8 dargestellten b- und y-Fragmentationen, wohingegen blau markierte Peaks aus einem zusätzlichen Wasserverlust hervorgingen. Sterisch verknüpfte b+y-Fragmentationen sind grün markiert. Das sterisch verknüpfte $b_{13}+y_4$ -Fragmentation (m/z 1739.2) ist zur Veranschaulichung schematisch dargestellt.

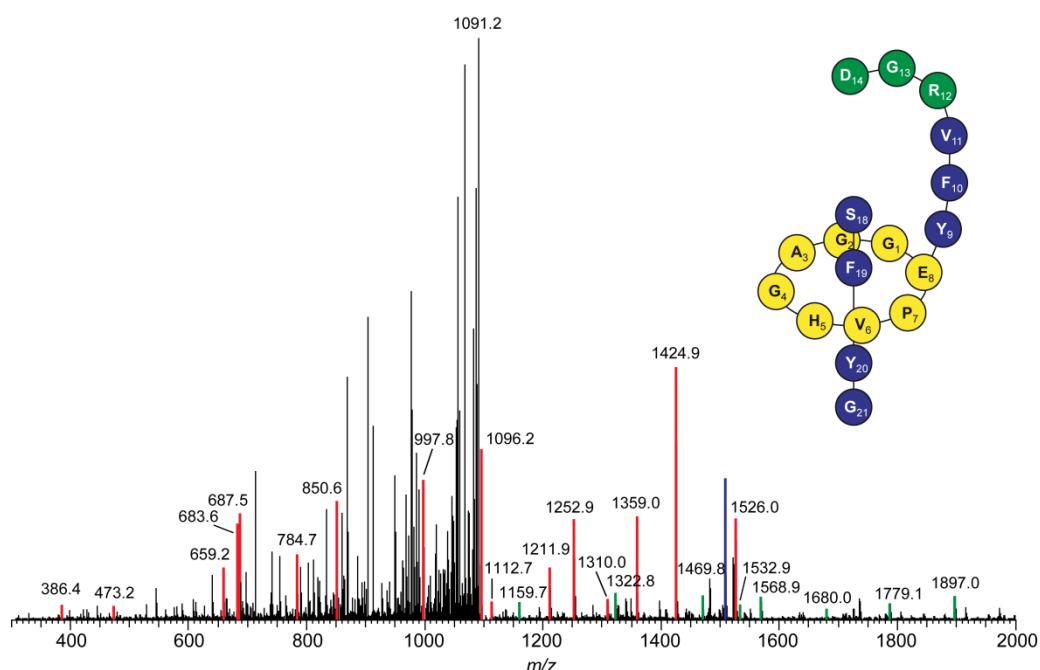


Abbildung 4.39: Fragmentierungsanalyse von MccJ25 RGD. MS²-Spektrum des m/z 1104.5 zweifach protonierten Vorläuferions von MccJ25 RGD. Rot markierte Peaks entsprechen den in Tabelle 4.9 dargestellten b- und y-Fragmentationen, wohingegen blau markierte Peaks aus einem zusätzlichen Wasserverlust hervorgingen. Sterisch verknüpfte b+y-Fragmentationen sind grün markiert. Das sterisch verknüpfte $b_{14}+y_4$ -Fragmentation (m/z 1897.0) ist zur Veranschaulichung schematisch dargestellt.

Tabelle 4.8: Experimentelle Fragmentierungsserien von MccJ25. Die Teilsequenzen der Fragmentionen sind hervorgehoben.

Fragmention		$[M + H]^+$ berechnet	$[M + H]^+$ beobachtet
C-terminale y-Serie			
GGAGHVPEYF VGIGTPISFYG	y ₁₁	1110.6	1110.8
GGAGHVPEYFVG IGTPISFYG	y ₈	841.4	841.4
GGAGHVPEYFVGIG TPISFYG	y ₇	784.4	784.6
GGAGHVPEYFVGIG TPISFYG	y ₆	683.3	683.5
GGAGHVPEYFVGIG TPISFYG	y ₅	586.3	586.3
GGAGHVPEYFVGIG TPISFYG	y ₄	473.2	473.3
GGAGHVPEYFVGIG TPISFYG	y ₃	386.2	386.3
N-terminale b- und a-Serie (-H₂O)			
GGAGHVPEYFVGIGTPISFYG	b ₁₅	1424.7	1424.8
GGAGHVPEYFVGIGTPISFYG	b ₁₄	1323.6	1323.5
GGAGHVPEYFVGIGTPISFYG	b ₁₃	1266.7	1267.0
GGAGHVPEYFVGIGTPISFYG	b ₁₂	1153.6	1153.8
GGAGHVPEYFVGIGTPISFYG	b ₁₁	1096.5	1096.7
GGAGHVPEYFVGIGTPISFYG	b ₁₀	997.5	997.7
GGAGHVPEYFVGIGTPISFYG	b ₉	850.4	850.3
GGAGHVPEYFVGIGTPISFYG	a ₈	659.3	659.6
Sterisch verknüpfte b+y-Serie			
GGAGHVPEYFVGIGT(PI)SFYG	b ₁₅ +y ₄	1896.9	1897.1
GGAGHVPEYFVGIGT(GTPI)SFYG	b ₁₃ +y ₄	1738.8	1739.2
GGAGHVPEYFVGIGT(IGTPI)SFYG	b ₁₂ +y ₄	1625.7	1625.8
GGAGHVPEYFVGIGT(GIGTPI)SFYG	b ₁₁ +y ₄	1568.7	1568.9
GGAGHVPEYFVGIGT(VGIGTPI)SFYG	b ₁₀ +y ₄	1469.7	1469.8
GGAGHVPEYFVGIGT(FVGIGTPI)SFYG	b ₉ +y ₄	1322.6	1322.9
GGAGHVPEYFVGIGT(GIGT)PISFYG	b ₁₁ +y ₆	1778.9	1779.2
GGAGHVPEYFVGIGT(VGIGT)PISFYG	b ₁₀ +y ₆	1679.8	1680.0
GGAGHVPEYFVGIGT(FVGIGT)PISFYG	b ₉ +y ₆	1532.7	1532.9

Das MS²-Spektrum von MccJ25 RGD zeigte die aus Peptidbindungsbrüchen im linearen C-Terminus resultierenden b- und y-Fragmentionen (Abbildung 4.39). Darüber hinaus konnten 8 binäre Peptidkomplexfragmente identifiziert werden (Tabelle 4.9). Diese setzten sich analog zu MccJ25 aus y₄- oder y₆-Fragmentionen in Kombination mit b-Tochterionen von 8 – 14 AS Länge zusammen. Exemplarisch ist in Abbildung 4.39 das binäre Peptidkomplexfragment b₁₄+y₄ (m/z 1897.0) gezeigt. Die Präsenz dieser komplexen Peptidfragmente beweist zweifelsfrei die Lassostruktur des MccJ25 RGD, da derartige Fragmentionen nicht mit einer verzweigt-zyklischen Struktur zu erklären sind.

Tabelle 4.9: Experimentelle Fragmentierungsserien von MccJ25 RGD. Die Teilsequenzen der Fragmentionen sind hervorgehoben.

Fragmention		$[M + H]^+$ berechnet	$[M + H]^+$ beobachtet
C-terminale y-Serie			
GGAGHVPEY FVRGDTPI SFYG	y ₁₂	1358.7	1359.0
GGAGHVPEY FVRGDTPI SFYG	y ₁₁	1211.6	1211.9
GGAGHVPEY FVRGDTPI SFYG	y ₁₀	1112.5	1112.7
GGAGHVPEY FVRGDTPI SFYG	y ₇	784.4	784.7
GGAGHVPEY FVRGDTPI SFYG	y ₆	683.3	683.6
GGAGHVPEY FVRGDTPI SFYG	y ₄	473.2	473.2
GGAGHVPEY FVRGDTPI SFYG	y ₃	386.2	386.4
N-terminale b- und a-Serie (-H₂O)			
GGAGHVPEYFVRGDTPI SFYG	b ₁₅	1525.7	1526.0
GGAGHVPEYFVRGDTPI SFYG	b ₁₄	1424.7	1424.9
GGAGHVPEYFVRGDTPI SFYG	b ₁₃	1309.6	1310.0
GGAGHVPEYFVRGDTPI SFYG	b ₁₂	1252.6	1252.9
GGAGHVPEYFVRGDTPI SFYG	b ₁₁	1096.5	1096.2
GGAGHVPEYFVRGDTPI SFYG	b ₁₀	997.5	997.8
GGAGHVPEYFVRGDTPI SFYG	b ₉	850.4	850.6
GGAGHVPEYFVRGDTPI SFYG	a ₈	659.3	659.2
Sterisch verknüpfte b+y-Serie			
GGAGHVPEYFVRGDTPI (S)FYG	b ₁₄ +y ₄	1896.9	1897.0
GGAGHVPEYFV (RGDTPI) S FYG	b ₁₁ +y ₄	1568.7	1568.9
GGAGHVPEYF (VRGDTPI) S FYG	b ₁₀ +y ₄	1469.6	1469.8
GGAGHVPEY (FVRGDTPI) S FYG	b ₉ +y ₄	1322.6	1322.8
GGAGHVPE (YFVRGDTPI) S FYG	b ₈ +y ₄	1159.5	1159.7
GGAGHVPEYFV (RGDT) PI SFYG	b ₁₁ +y ₆	1778.9	1779.1
GGAGHVPEYF (VRGDT) PI SFYG	b ₁₀ +y ₆	1679.8	1680.0
GGAGHVPEY (FVRGDT) PI SFYG	b ₉ +y ₆	1532.7	1532.9

4.4.3 Integrinbindungsstudien von MccJ25 RGD

Die Affinität von MccJ25 RGD zu $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ Integrinen wurde mit Hilfe eines *in vitro* Ligandenbindungs-Inhibitionsassays in Kooperation mit Prof. Horst Kessler (Technische Universität München) untersucht. Als Kontrolle dienten Cilengitid, MccJ25 und das 7-AS Peptid Ac-FVRGDTN-NH₂, das der Sequenz von MccJ25 RGD um das insertierte RGD-Motiv entspricht. MccJ25 zeigte weder zu $\alpha_v\beta_3$ noch zu $\alpha_v\beta_5$ eine signifikante Affinität (Tabelle 4.10). Dagegen führte die Insertion des RGD-Motivs innerhalb der β -Haarnadelstruktur zu einer drastischen Steigerung der Affinität, mit IC₅₀-Werten von 17.2 nM ($\alpha_v\beta_3$) und 169.4 nM ($\alpha_v\beta_5$). Die Substitution von Gly12-Gly14 durch das RGD-Epitop konvertierte folglich das inaktive MccJ25 in einen nanomolaren Integrininhibitor. Interessanterweise zeigte das lineare Peptid mit einem IC₅₀-Wert von 42.6 nM eine nur zweifach geringere Affinität für $\alpha_v\beta_3$, so dass der Effekt des Lassoerüsts im MccJ25 RGD auf die

Integrinbindung in diesem Fall minimal zu sein scheint. Die Affinität der internen Kontrolle Cilengitid stimmte sehr gut mit den Literaturwerten von 0.58 nM ($\alpha_v\beta_3$) und 37 nM ($\alpha_v\beta_5$) überein [163,164].

Tabelle 4.10: Affinität von MccJ25 RGD zu $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ Integrinen. Gezeigt sind die IC_{50} -Werte im Vergleich zu MccJ25, dem linearen Heptapeptid Ac-FVRGDTP-NH₂ und Cilengitid.

Peptid	$\alpha_v\beta_3$ (IC_{50} in nM)	$\alpha_v\beta_5$ (IC_{50} in nM)
MccJ25	>10000	>10000
MccJ25 RGD	17.2	169.4
7er Peptid (Ac-FVRGDTP-NH ₂)	42.6	>50000
Cilengitid	0.92	25.4

4.4.4 Angiogenese- und Proliferationshemmstudien von MccJ25 RGD

Die Affinität von MccJ25 RGD zu $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ Integrinen, die anhand der *in vitro* Studien beobachtet worden war, sollte anschließend auf eine Aktivität *in vivo* hin untersucht werden. Dazu wurden sowohl Proliferationshemmstudien als auch Angiogeneseassays in Kooperation mit Dr. Florenz Sasse (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass MccJ25 RGD einen signifikanten Einfluss auf die Kapillarbildung von humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) hat (Abbildung 4.40). Die Gefäßbildung durch HUVEC ist in Gegenwart von 1.2 µg/mL MccJ25 RGD erwartungsgemäß zu beobachten. Mit steigender Peptidkonzentration tritt dagegen eine deutliche Hemmung der Kapillarbildung ein, wobei die minimale Hemmkonzentration mit 10.9 µg/mL angegeben werden kann. Im Vergleich dazu zeigten weder MccJ25 noch das lineare Heptapeptid, für das *in vitro* ein IC_{50} -Wert von 42.6 nM für $\alpha_v\beta_3$ bestimmt wurde, einen Einfluss auf die Angiogenese. Für das Referenzpeptid Cilengitid konnte eine anti-angiogenetische Wirkung mit einer minimalen Hemmkonzentration von 10 µg/mL beobachtet werden, was mit der des modifizierten Lassoepitops vergleichbar war. Besonders hervorzuheben ist, dass MccJ25 RGD in Proliferationshemmstudien mit HUVEC keine inhibitorische Wirkung bis zu einer Konzentration von 125 µg/mL zeigte. Folglich handelt es sich bei dem beobachteten Effekt auf die Kapillarbildung um eine spezifische Hemmung der Angiogenese, die sich nicht auf die Vitalität der Zellen auswirkt. Durch den großen Abstand zwischen anti-angiogenetischer Wirkung und Cytotoxizität kann MccJ25 RGD eine hohe therapeutische Breite bescheinigt werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Insertion des RGD-Epitops in das MccJ25-Gerüst zu einem weiterhin lassostrukturierten Peptid führte, dass eine nanomolare Affinität zu $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ Integrinen besitzt, die an der Tumoriangiogenese beteiligt sind. Desweiteren konnten die ermittelten *in vitro* Affinitätsdaten durch eine anti-angiogenetische Wirkung *in vivo* bestätigt werden, wobei das modifizierte Lassoepitop aufgrund seiner geringen Cytotoxizität über eine große therapeutische Breite verfügt. Die Insertion des RGD-Epitops führte also eine neue biologische Aktivität in das Lassoepitopgerüst ein und generierte einen durch Fermentation von *E. coli* zu gewinnenden Angiogeneseinhibitor.

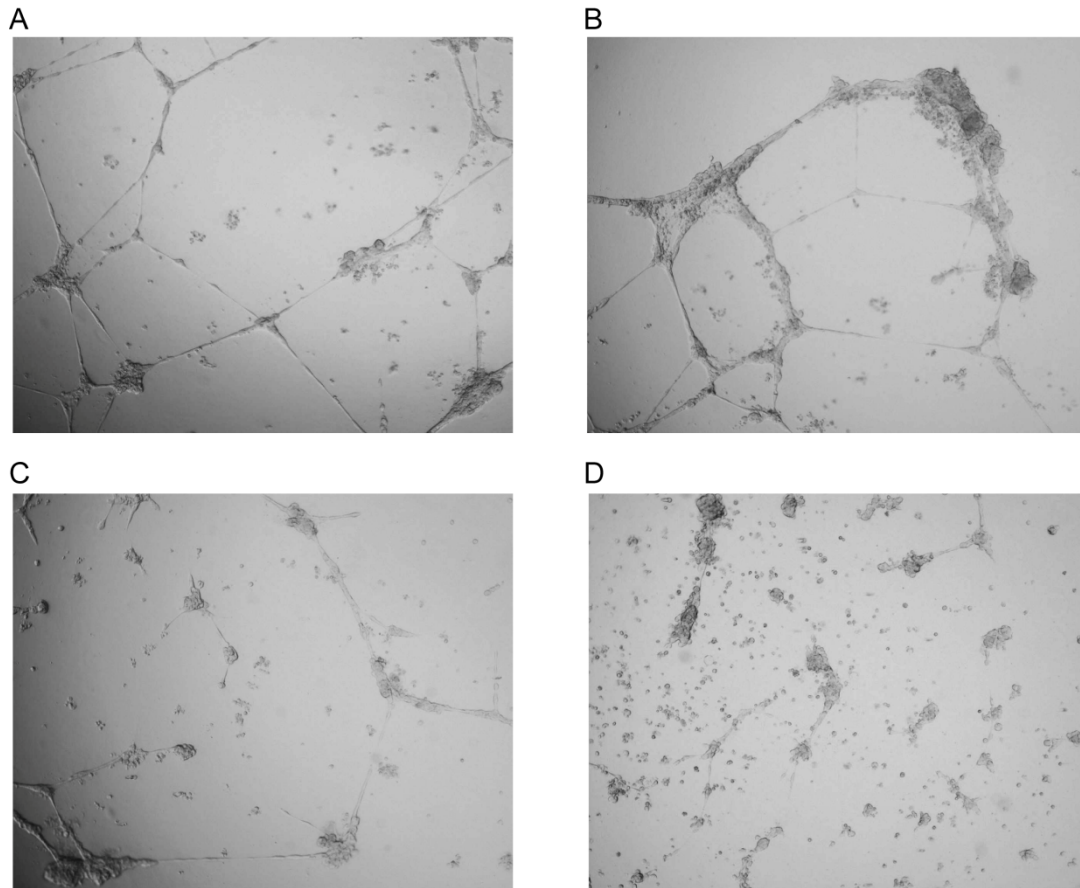


Abbildung 4.40: Anti-angiogenetische Wirkung von MccJ25 RGD. Die mikroskopischen Bilder zeigen die Gefäßbildung durch HUVEC auf Matrigel-Substrat. (A) Normale Kapillarbildung in Gegenwart von 1.2 µg/mL MccJ25 RGD. (B,C,D) Mit steigender Peptidkonzentration wird eine deutliche Hemmung der Gefäßbildung beobachtet (B: 3.6 µg/mL, C: 10.9 µg/mL, D: 33 µg/mL).

5. Diskussion

5.1 Capistruin – ein Lassozeptid aus *Burkholderia thailandensis* E264

Rationale Strategien spielen bei der Isolierung neuer Naturstoffe in zunehmendem Maße eine entscheidende Rolle. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein rationaler Ansatz zur Identifizierung von Lassozeptidbiosyntheseclustern in Bakterien entwickelt und dessen Potential durch die Isolierung des neuartigen Lassozeptids Capistruin aus *Burkholderia thailandensis* E264 verdeutlicht. Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Struktur-, Stabilitäts- und Biosynthesestudien von Capistruin diskutiert werden, um anschließend eine optimierte Strategie des Genomischen Minings zur Identifizierung neuer Lassozeptide zu entwickeln.

5.1.1 Homologe und heterologe Produktion von Capistruin

Kryptische Gencluster, die für die Biosynthese von Naturstoffen kodieren, können durch Genomisches Mining vorhergesagt und damit Bakterien als Produzenten für diese putativen Verbindungen postuliert werden [8,9,11,186]. Die Anwendung dieser Strategie führte zur Identifizierung des *capABCD*-Biosyntheseclusters in *Burkholderia thailandensis* E264. Demzufolge wurde das gramnegative Bakterium als Produzent des putativen Lassozeptids Capistruin postuliert. Durch massenspektrometrische Analysen des Kulturüberstands konnte das putative Lassozeptid nachgewiesen werden. Die Expression des *capABCD*-Genclusters in *E. coli* führte zur heterologen Produktion des Peptids, so dass das identifizierte Gencluster zweifelsfrei für die Biosynthese des neu isolierten Naturstoffs verantwortlich ist.

Im Allgemeinen ist die Produktion der vorhergesagten Naturstoffe zum einen von der Funktionalität des Genclusters und zum anderen von der Wahl der Kultivierungsbedingungen abhängig. In der Natur wird die Biosynthese von Sekundärmetaboliten durch die gegenwärtigen Wachstumsbedingungen innerhalb des Habitats beeinflusst, so dass die Isolierung der Naturstoffe der erfolgreichen Simulation dieser Gegebenheiten bedarf. Der Einfluss der Laborbedingungen auf die Produktion von Sekundärmetaboliten wurde eindrucksvoll durch den OSMAC-Ansatz gezeigt, wo durch systematische Variation der Kultivierungsparameter bis zu 20 verschiedene Metabolite aus einem Stamm isoliert werden konnten [12]. Eine deutliche Abhängigkeit der Naturstoffproduktion von den gewählten Wachstumsbedingungen wurde auch für Capistruin beobachtet, da in M20-Medium eine ~300-fache Erhöhung der Produktion im Vergleich zum ursprünglich verwendeten M9-Medium beobachtet wurde. Die Ursache für diesen signifikanten Unterschied ist bisher unklar, könnte aber in den unterschiedlichen Kohlenstoffquellen und Phosphatkonzentrationen begründet liegen. Glucose, die im M9-Medium als Kohlenstoffquelle Verwendung fand, kann zu einer Repression der Biosynthese von Sekundärmetaboliten führen, wohingegen die hohen Phosphatkonzentrationen des M20-Mediums eine Induktion der Naturstoffbiosynthese zur Folge haben können [12]. Die erfolgreiche Produktion von Capistruin in LB-Medium zeigt ferner, dass die Synthese nicht auf die Verwendung von Minimalmedien beschränkt ist. Desweiteren war die

Produktion des Lassopeptids nicht wie im Falle des MccJ25 und anderer Antibiotika auf die stationäre Phase limitiert [156,187], sondern erfolgte bereits in der exponentiellen Wachstumsphase. Damit ist eine Aktivierung der Capistruinbiosynthese durch ein Nährstoffmangelsignal, das im Allgemeinen für die Induktion beim Eintritt in die stationäre Phase verantwortlich ist, auszuschließen.

Neben der homologen Produktion von Capistruin zeigte auch die heterologe Synthese des Peptids in *E. coli* eine Abhängigkeit von den gegebenen Fermentationsbedingungen. Capistruin wurde in Minimalmedien wie M9, M20 und M63 nach IPTG-induzierter Transkription des *capABCD*-Genclusters synthetisiert und sekretiert, wohingegen in LB-Medium keine Produktion nachgewiesen werden konnte. Dieser Unterschied kann vermutlich durch einen intrazellulären, proteolytischen Abbau des proteaselabilen Vorläuferproteins bei Fermentation in LB-Medium erklärt werden, wodurch CapA der Konversion in das lassostrukturierte Peptid entzogen wird. Für diese Theorie spricht auch, dass eine Reinigung von His(6)-CapA aus *E. coli* nach heterologer Expression in LB-Medium nicht möglich war.

Die heterologe Capistruinsynthese in *E. coli* lag mit Ausbeuten im Bereich von 0.2 mg/L Kultur unter denen der nativen Produktion. Für die Mutanten wurde ein weiterer Rückgang der Produktionsmenge beobachtet, so dass Bioaktivitätsstudien von ausgewählten Varianten nicht realisierbar waren. Dagegen lieferte die Produktion von Capistruin F5A in *B. thailandensis* E264 nach Rhamnose-induzierter Expression der CapA-Variante Ausbeuten auf Wildtypniveau. In Kombination mit einem Knockout des chromosomalen *capA*-Gens wird diese pSCrhaB2-basierte homologe Expression der Varianten die Überwindung der bisherigen Limitierungen des heterologen Systems erlauben. Dass *B. thailandensis* E264 genetisch zugänglich ist, wurde vor kurzem durch Arbeiten zum *quorum sensing* und zur Bactobolinproduktion gezeigt [188-190].

5.1.2 C-terminale Abbauprodukte des Capistruins

Bei den ersten Isolierungsversuchen von Capistruin wurde das Peptid lediglich in der 24-stündigen Fermentation nachgewiesen, während es nach 48- bzw. 72-stündiger Inkubation nicht zu detektieren war. Diese Diskrepanz liegt in der C-terminalen Degradation begründet. Bei längerer Fermentation erfolgt der C-terminale Abbau unter Bildung von Capistruin ΔN und Capistruin ΔFN . Die Simulation der Degradation *in vitro* mittels Carboxypeptidase Y aus *S. cerevisiae* zeigt, dass wahrscheinlich eine Carboxypeptidase für diese Reaktion verantwortlich ist. Dabei handelt es sich vermutlich um ein extrazelluläres Enzym, das in der stationären Phase synthetisiert und sekretiert wird, da der Abbau erst nach Übergang in die stationäre Phase zu beobachten ist. Ein C-terminaler Abbau wurde auch für andere verzweigt-zyklische Peptide mit putativer Lassostruktur beschrieben. Für Anantin wurde das aus der Abspaltung des C-terminalen Phe17 resultierende DesPhe-Anantin gefunden [117] und für Propeptin konnte das Propeptin-2, dem die zwei C-terminalen Aminosäuren Ser und Pro fehlen, nachgewiesen werden [191]. Interessanterweise zeigte das verkürzte Propeptin eine 100-fach geringere antibakterielle Aktivität gegen *Mycobacterium phlei* [191]. Bei Studien der Proteasesensitivität von Lariat A wurde beobachtet, dass das Lassopeptid nicht durch Arginyl-Endopeptidase, Acromobacter Protease I, V8 Protease, Endoprotease Asp-N, Trypsin und Chymotrypsin hydrolysiert werden konnte, aber Carboxypeptidase P die Abspaltung der beiden

C-terminalen Aminosäuren Lys und Pro katalysierte [110]. Diese Abspaltung führte zum Verlust der antimycobakteriellen Aktivität [192]. Die Existenz von C-terminalen Abbauprodukten bekannter oder postulierter Lasso peptide zeigt, dass es sich dabei um ein generelles Phänomen handelt, das bei der Suche nach neuen Lasso peptiden im Hinblick auf die massenspektrometrische Analytik berücksichtigt werden muss. Außerdem lässt die Reduktion der Bioaktivität, die bei den verkürzten Peptiden beobachtet wurde, auf einen möglichen physiologischen Hintergrund des proteolytischen Abbaus schließen. Die Degradation könnte neben dem Export einen zweiten Immunitätsmechanismus zur Inaktivierung der produzierten bioaktiven Peptide darstellen (Abbildung 5.1). Dieser Hypothese gilt es in Zukunft durch Bioaktivitätsstudien von Capistruin ΔN und Capistruin ΔFN nachzugehen, die mittels Verdau durch Carboxypeptidase Y bzw. durch geeignete Wahl der Fermentationsbedingungen in homogener Form produziert werden können. Darüber hinaus ist die Identifizierung der verantwortlichen Carboxypeptidase interessant, die durch eine klassische aktivitätsgeleitete Proteinreinigung der extrazellulären Proteine isoliert werden könnte.

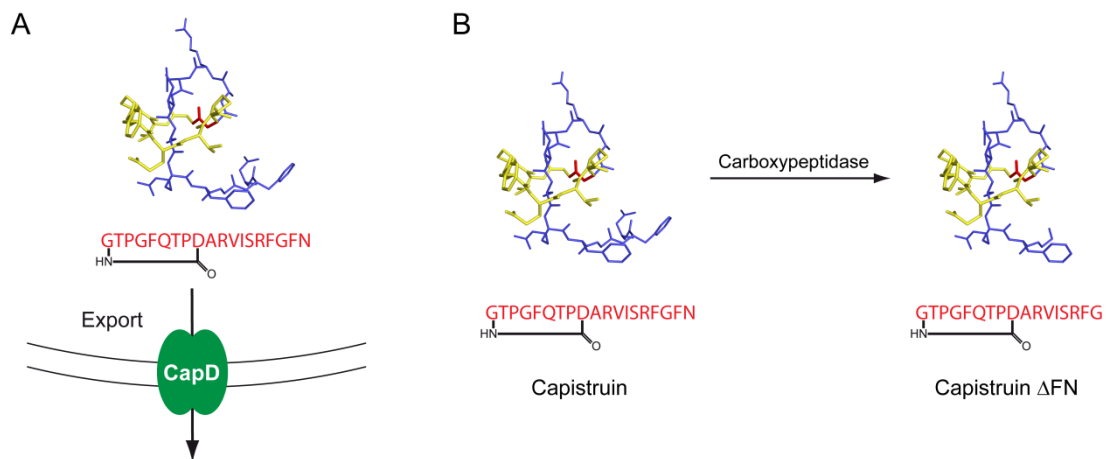


Abbildung 5.1: Immunitätsstrategien. (A) CapD-vermittelter Export verringert die intrazelluläre Konzentration von Capistruin. (B) Mögliche extrazelluläre Inaktivierung durch Carboxypeptidase katalysierte C-terminale Degradation.

5.1.3 Struktur und Stabilität des Lasso peptids Capistruin

Die postulierte Lassostruktur von Capistruin wurde mit Hilfe von massenspektrometrischen und NMR-spektroskopischen Untersuchungen eindeutig bewiesen. Das Peptid zeigte ein schwaches Fragmentierungsverhalten bei MS/MS-Studien mit einem dominierenden Verlust von Neutralkörpern. Interessanterweise wurden sowohl bei dem Wildtyp als auch bei den lassostrukturierten Varianten keine Fragmente beobachtet, die aus Peptidbindungsbrüchen zwischen den Positionen 9 (Asp im Wildtyp) und 10 (Ala) bzw. 10 (Ala) und 11 (Arg) resultierten. Die NMR-Struktur von Capistruin liefert eine mögliche Erklärung für das Fehlen dieser γ_9 - und γ_{10} -Fragmentationen (Abbildung 5.2A). Arg15 ist die erste Aminosäure, die sich unterhalb der Ringebene befindet und anhand der Fragmentierungsstudien von Capistruin F16A/F18A wurde gezeigt, dass die sterisch anspruchsvolle Seitenkette den C-Terminus stabil im Makrolaktamring verankern, also den Zyklus nicht passieren kann. Demzufolge sollte auch Arg11 auf der gegenüberliegenden Seite nicht

dazu in der Lage sein. Aus einem Bindungsbruch N-terminal von Arg11 innerhalb des C-Terminus würde demnach ein lineares Tochterfragmention resultieren, das durch Arg11 und Arg15 auf beiden Seiten der Ringebene im Zyklus verankert ist (Abbildung 5.2B - D). Dieser binäre Peptidkomplex besäße eine zum Wildtyp identische Masse und könnte daher massenspektrometrisch nicht von Capistruin unterschieden werden. Analoge binäre Peptidkomplexe sind für MccJ25 beschrieben und wurden auch im Rahmen der MccJ25 RGD Strukturuntersuchungen in dieser Arbeit beobachtet [109,128]. Im Falle des Capistruins ist allerdings die Detektion dieser Komplexe aus b- und y-Fragmentationen aufgrund der fehlenden Massendifferenz nicht möglich, so dass ihre Existenz spekulativ bleibt.

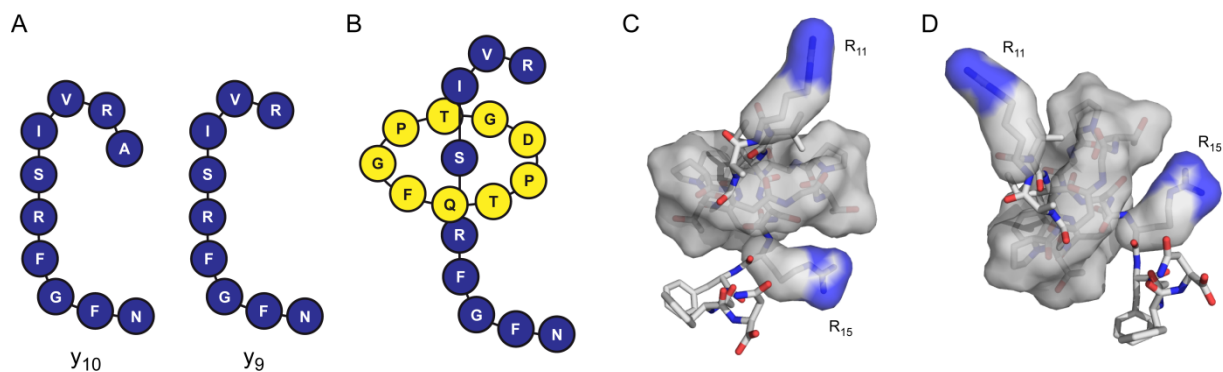


Abbildung 5.2: Mögliche binäre Peptidkomplexfragmente bei der Fragmentierung von Capistruin in der Gasphase. (A) Schematische Darstellung der y₉- und y₁₀-Fragmentationen, die bei der Fragmentierungsanalyse von Capistruin nicht beobachtet wurden. (B) Schema des postulierten binären b₉+y₉-Peptidkomplexfragments von Capistruin. (C) Veranschaulichung der sterischen Anforderung der beiden Argininreste Arg11 und Arg15 als mögliche Ursache für die stabile Verankerung des y₉-Fragmentions innerhalb des b₉-Fragments. Die lösungsmittelzugängliche Oberfläche des Makrolaktamrings und der Argininseitenketten ist transparent gezeigt. (D) Abgeleitet aus (C) durch 60°-Drehung um die z-Achse.

Das charakteristische Fragmentierungsverhalten wurde allerdings nicht für alle lassostrukturierten Capistruinvarianten beobachtet und besitzt demzufolge keine allgemeine Gültigkeit. Das MS²-Spektrum der Elastase-insensitiven Capistruin R15A/F16A-Variante zeigte nicht das prototypische Verhalten, obwohl eine Lassostruktur aufgrund der Stabilität gegenüber Elastase angenommen werden kann. Es war mit lediglich geringen Unterschieden in der Fragmentintensität keine signifikante Abweichung vom MS²-Spektrum der Elastase-sensitiven Konformation zu erkennen. Eine Erklärung für diese Beobachtung liegt vermutlich in der Temperaturlabilität der Variante begründet. Vermutlich erfolgt bei den Gasphasen-Fragmentierungsstudien unter den gegebenen Bedingungen in der Kollisionszelle ebenfalls eine Entfaltung der Lassostruktur, so dass letztendlich ein Peptid mit einer verzweigt-zyklischen Struktur analysiert wird.

Darüber hinaus zeigte die temperaturlabile Capistruin R15A/F16A-Variante, dass Phenylalanin an Position 18 keine thermostabile Verankerung des C-Terminus innerhalb des Makrolaktamrings gewährleisten kann. Selbst bei der Fermentationstemperatur von 42 °C liegt ein Anteil des Peptids in

der verzweigt-zyklischen Konformation vor. Die thermische Entfaltung einer Lassostruktur wurde zum ersten Mal überhaupt bei dieser Capistruinvariante beobachtet.

Im Gegensatz dazu wurden die aromatischen Aminosäuren Phe, Tyr und Trp bei der Analyse des Fixierungspotentials sterisch anspruchsvoller Aminosäuren an Position 15 des Capistruins als Substituenten des Arginins identifiziert, die eine thermostabile Lassostruktur generierten. Demzufolge ist das Potential von Phenylalanin, den C-Terminus thermostabil im Ring zu verankern, abhängig von der Position innerhalb des C-Terminus und somit nicht allein durch den sterischen Anspruch der Seitenkette definiert. Vermutlich spielen die Länge, Anzahl der Freiheitsgrade und damit die Flexibilität des Schleifenbereichs oberhalb der Ringebene eine entscheidende Rolle bei der Entfaltung. Im Falle des Capistruins R15F/F16A/F18A kann von einer zum Capistruin analogen Struktur und damit von einer Lokalisierung von Ala10-Ile13 oberhalb der Ringebene ausgegangen werden. Dagegen ist bei der Doppelmutante Capistruin R15A/F16A vermutlich Phe18 direkt unterhalb der Ringebene positioniert, womit sich Ala10-Phe16 auf der gegenüberliegenden Seite, also oberhalb der Ringebene befinden (Abbildung 5.3). Bei einer Energiezufuhr durch Erhöhung der Temperatur kann somit die längere Peptidsequenz bei Capistruin R15A/F16A mehr Energie aufnehmen und bei der Entfaltung der Lassostruktur assistieren.

Neben den aromatischen Aminosäuren tolerierte die Biosynthesemaschinerie Lysin an Position 15 und das resultierende Capistruin R15K/F16A/F18A lag nach der Fermentation ausschließlich in einer lassostrukturierten, Elastase-insensitiven Konformation vor. Eine Inkubation bei 95 °C führte jedoch zu einer Entfaltung in eine verzweigt-zyklische, Elastase-sensitive Konformation (Abbildung 5.3). Die Entfaltung war qualitativ langsamer im Vergleich zu Capistruin R15A/F16A, da selbst nach zehnfach längerer Inkubation bei 95 °C nicht alle Moleküle entfaltet werden konnten. In beiden Fällen zeigte die Verwendung von chemischen Denaturierungsmitteln wie GdmCl, das zur Denaturierung von Proteinstrukturen Anwendung findet, keinen Effekt auf die Entfaltung der Lassostruktur. Folglich geht es bei der Auflösung der Lassoform nicht um das Unterdrücken von intramolekularen Wechselwirkungen, sondern um die thermisch induzierbare Entfaltung einer sterisch fixierten, entropisch ungünstigen Struktur. Die vollständige Analyse des generellen Fixierungspotentials voluminöser Aminosäuren und deren Positionsabhängigkeit ist momentan durch die Verwendung des *in vivo* Produktionssystems limitiert, da sehr instabile Varianten vermutlich aufgrund ihrer Proteaselabilität eine sehr kurze Halbwertszeit besitzen und damit nicht detektiert werden können. Demzufolge ist in kritischen Fällen unklar, ob die prozessierenden Enzyme das mutierte Vorläuferprotein nicht konvertieren können, oder ob das instabile Lassozeptid abgebaut wurde. Darüber hinaus fanden alle bisherigen Untersuchungen in Extrakten des Kulturüberstands statt, da die produzierten Variantemengen keine präparative Aufreinigung erlaubten. Eine Erhöhung der Ausbeute scheint zukünftig durch das entwickelte homologe Produktionssystem möglich zu sein. Dennoch konnte mit dem verwendeten Ansatz ein erster Einblick in die Struktur-Stabilitäts-Beziehungen von Capistruin gewonnen und mit den beiden temperaturlabilen Varianten die Entfaltung der Lassostruktur zum ersten Mal *in vitro* verfolgt werden.

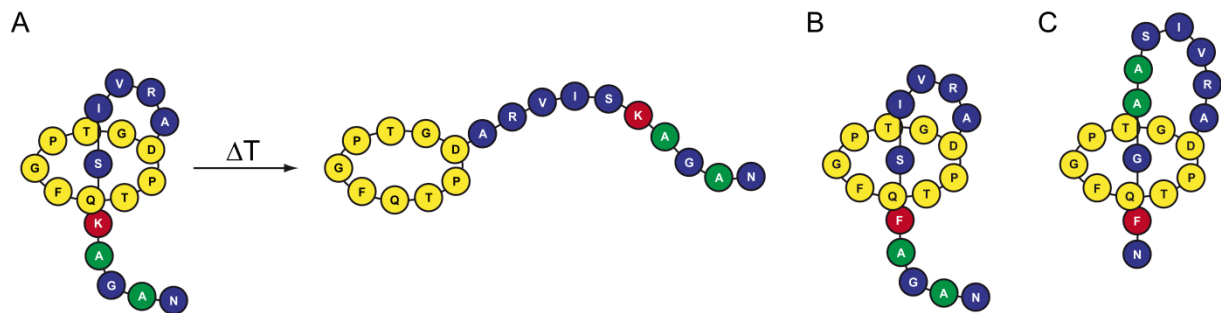


Abbildung 5.3: Thermische Entfaltung von lassostrukturierten Capistruinvarianten. (A) Schema zur Hitzedenaturierung der Lassostruktur von Capistruin R15K/F16A/F18A. (B) Schematische Darstellung des thermostabilen Capistruin R15F/F16A/F18A. (C) Schematische Darstellung der vermuteten Struktur des temperatursensitiven Lasso-peptids Capistruin R15A/F16A. In beiden Fällen dient Phenylalanin als sterisch anspruchsvolle Aminosäure zur Verankerung des C-Terminus.

Capistruin stellt neben MccJ25, RES-701-1 und Lariat A das vierte Lasso-peptid der Klasse II dar. Obwohl die vier Vertreter eine ähnliche Primärstruktur besitzen und das Lassostrukturmotiv gemeinsam haben, zeigen sie signifikante strukturelle Unterschiede. Die Strukturen von MccJ25 [109,122,123], Lariat A [110] und Capistruin [181] stimmen in einem kurzen antiparallelen β -Faltblatt überein, das zwischen dem N-terminalen Makrozyklus und dem hindurch gefädelten C-terminalen Schwanz gebildet wird (Abbildung 5.4). MccJ25 verfügt darüber hinaus über ein zweites antiparalleles β -Faltblatt innerhalb des C-Terminus, das zur Ausbildung der β -Haarnadelstruktur führt. Bei MccJ25 ist der C-Terminus durch Phe19 und Tyr20 auf gegenüberliegenden Seiten des Rings sterisch fixiert, so dass der C-terminale Schwanz sich nicht mehr innerhalb des Rings bewegen kann. Bei der Mutagenesestudie von Severinov *et al.* wurde beobachtet, dass Tyr20, das den Stöpsel unterhalb der Ringebene repräsentiert, lediglich durch die beiden sterisch anspruchsvollen Aminosäuren Phenylalanin und Isoleucin substituiert werden konnte [146]. Alle anderen proteinogenen Aminosäuren wurden entweder nicht von der Biosynthesemaschinerie toleriert oder lieferten keine stabilen Lassostrukturen. Die Verwendung von Phe19 als zweiten Stöpsel oberhalb der Ringebene ist einzigartig für MccJ25 und könnte seine Ursache in dem beobachteten Entfaltungsverhalten von Capistruin R15A/F16A im Vergleich zu Capistruin R15F/F16A/F18A besitzen. Die β -Haarnadelstruktur in MccJ25 sollte in der Lage sein, bei höheren Temperaturen bei der Entfaltung zu assistieren. Eine unflexible Fixierung auf beiden Seiten der Ringebene könnte diesem Effekt entgegenwirken. Bei den Lassostrukturen von Capistruin und Lariat ist ein solcher zweiter Stöpsel vermutlich nicht notwendig, da die Ringspannung der Schleife ein weiteres Passieren des C-Terminus durch den Makrozyklus verhindert.

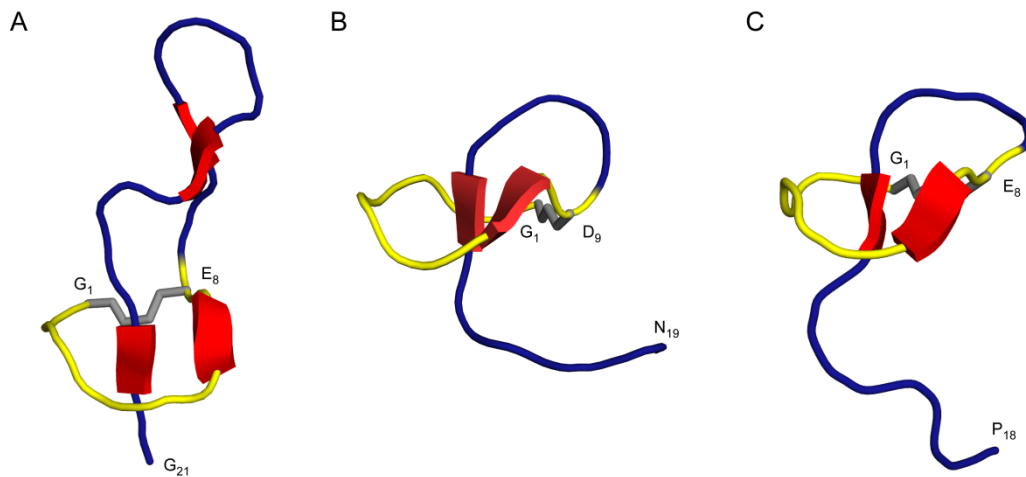


Abbildung 5.4: Strukturvergleich der Klasse II-Lasso peptide MccJ25, Capistruin und Lariat A. Ribbon-Darstellung von MccJ25 (A), Capistruin (B) und Lariat A (C). Der N-terminale Makrolaktamring ist in gelb, die Isopeptidbindung in grau und der hindurch gefädelt C-Terminus in blau gezeigt. Alle Strukturen sind durch kurze antiparallele β -Faltblätter (rot) charakterisiert.

5.1.4 Biosynthese von Capistruin

Die Biosynthese von Lasso peptiden ist im Detail bisher wenig verstanden und basiert überwiegend auf Homologievergleichen. Zu Beginn dieser Arbeit war zudem mit dem *mcjABCD*-Gencluster der MccJ25-Biosynthese lediglich ein Biosynthesecuster bekannt. Durch die Identifizierung des *capABCD*-Clusters im Rahmen dieser Untersuchungen und durch die Sequenzierung des Anantinproduzenten *Streptomyces coeruleus* in der Arbeitsgruppe Marahiel (Marcel Zimmermann, unveröffentlichte Ergebnisse) sind mittlerweile Sequenzen dreier Gencluster bekannt, die für die Biosynthese von Klasse II-Lasso peptiden verantwortlich sind. Durch Alignments der prozessierenden Enzyme kann daher über die essentiellen katalytischen Reste der Reifungsproteine spekuliert werden.

Das Sequenzalignment von McjB und CapB zeigt, dass die beiden Proteine innerhalb des C-terminalen Bereichs die höchste Homologie aufweisen (Abbildung 5.5). Da bakterielle Transglutaminasen, die vermutlich meist als Proteasen fungieren und geringe Ähnlichkeit zu den B-Proteinen bakterieller Lasso cluster besitzen, über eine katalytische Triade aus Cys, His und Asp verfügen, könnten die in beiden Proteinen konservierten Reste Cys149, His181 und Asp193 das aktive Zentrum von CapB bilden [133]. Alternativ zu Cys149 wäre das ebenfalls konservierte Ser153 als Nukleophil und das Glu185 zur Stabilisierung des im Verlauf der Katalyse protonierten His181 denkbar. Alle fünf Reste sind mit Ausnahme von Asp193, das durch Glutamat substituiert ist, auch in AnB, der putativen Protease des Anantinclusters, konserviert.

CapB	MQSRRYFLYDEACAKAFADHYLDFKPIDAPHALKPLISDRIVVAASPASVPKR----IAD	56
McjB	MIRYCLTSYREDL-----VILDTINCSFSTVPDAGSLIKERDKLLKE	35
CapB	YRGWAFDTFDSGIWASRTIGERSAAGF---EW-----LPFWRIVRGA	95
McjB	FPQLSY--FFDSEYHI-GSVSRNSDTSELEERWFLPEPDKTLYKCSLFKRFILLKVFYYS	100
CapB	VSLKMRGFR---ALSALDRLARLDAGAEQVRADGGPSRTAERYLRASIT-----WS	143
McjB	WNIEKKGMWIFISNKKENRLYSI-----NEHLIRKETISNLSIIFHLN	144
CapB	PERITCLQMSFALATHIRRENVPQQLVIGVRPMPEVAHAWVEIDGRVCGDEPELKKSYSYE	203
McjB	IEKSDCLITYSYALKRIINSRNIDAHVIGVVRTQPFYSHSNVEVGGOVINDAPNMRDKLSV	204
CapB	TYRTPRHDERAGPFGGLAA	221
McjB	IAE-----I	208

Abbildung 5.5: Sequenzalignment der beiden putativen Proteasen CapB und McjB. Die Aminosäuren der postulierten katalytischen Triade Cys-His-Asp sind mit einem roten Stern markiert. Alternative Reste des aktiven Zentrums sind mit einem schwarzen Stern gekennzeichnet. Identische Reste sind rot, ähnliche Reste blau hinterlegt. Das Alignment wurde mittels T-Coffee erstellt [193,194].

Im Falle von CapC zeigen Sequenzvergleiche mit McjC und der homologen Asparagin Synthetase B (AsnB), dass die zur Koordination des Mg^{2+} -Ions sowie die zur Bindung des ATP in AsnB essentiellen Reste in beiden Reifungsenzymen konserviert sind (Abbildung 5.6). In CapC wird das Mg^{2+} -Ion vermutlich durch Asp232 und Asp333 koordiniert, während Ser228, Ser233, Gly329, Arg480 und Thr500 bei der Bindung des ATP eine Rolle spielen. Diese Reste sind ebenfalls in AnC, dem CapC-Homologen des Anantinbiosynthesecusters, konserviert. Interessanterweise sind die in AsnB für die Hydrolyse des Glutamins notwendigen Reste Arg49, Asn74, Glu76 und Asp98 sowie die bei der Bindung der α -Aminogruppe bzw. α -Carboxylgruppe des Aspartats involvierten Reste Asp385 bzw. Arg388 in keinem der prozessierenden Enzyme konserviert. Allerdings ist die Glutaminhydrolyseaktivität für die Lasso-peptidsynthese nicht notwendig, da das Nukleophil mit der N-terminalen α -NH₂-Gruppe bereits intramolekular vorliegt. Ebenso ist eine spezifische Interaktion mit der α -Aminogruppe bzw. α -Carboxylgruppe des zu adenylierenden Asp/Glu nicht vonnöten, da die Aminosäure als Teil einer Peptidkette vorliegt.

Mutationsanalysen werden notwendig sein, um eine essentielle Rolle der in CapB und CapC identifizierten Reste bei der Prozessierung des Vorläuferproteins CapA zu belegen. Dazu ist die *in vitro* Rekonstitution der Capistruinbiosynthese die entscheidende Voraussetzung, da bei *in vivo* Untersuchungen ein durch die eingeführte Mutation verursachter Faltungsdefekt zu falsch negativen Ergebnissen führen kann. Die lösliche Expression und Reinigung der beiden Reifungsenzyme ist dabei nach der in dieser Arbeit beschriebenen Darstellung von CapA der limitierende Faktor. Um dieses Ziel zu realisieren, sind nach der erfolglosen Anwendung der literaturbekannten Strategien zur Löslichkeitsoptimierung alternative Wege zu beschreiten. Dafür kommt neben der Expression in *B. thailandensis* E264 mit Hilfe des pSCrhaB2-Vektors [150] die Verwendung des SlyD-Proteins in Frage, einer Prolylisomerase mit Chaperonaktivität aus *E. coli* [195-197], die als Fusionsprotein die Gewinnung von stark aggregationsanfälligen viralen Hüllproteinen in immunoreaktiver Form erlaubte [198,199].

CapC	M-----AKSIERRDM-TNA-----PARSGWRLERGAWTDARGYRALLSL	38
McjC	MEIFNVKLNDSIRIIFCKTLSAFRTENTIVMLKGKAVSNG-----	41
AsnB	M-----CSIFGVFDIKTDAVELRKKALELSRLMRHRGPDWSGIYASDNA	44
CapC	DAA-----PDRFIGV-----TLLEAGDRARAYLRDAHSRIE	69
McjC	-----KPV-----TE	47
AsnB	ILAHERLSIVDVNAGAOFLYNQOKTHVLAVNGEIYNHQALRAEYGDR---YQFQTGSDCE	101
CapC	RSLARARTLQEAR-DTVTRSVWGAYLLVLDEAASGRRLFMPDPLHSVRLYYRTDERGRVD	128
McjC	EI---ARVVEEKGVSSEVIENLDGVFCILIIYHF--NDLLIGKSIQS-GPALFYCKKNMDIF	101
AsnB	VI---LALYQEKG-PEFLDDLQCMFAFALYDSEKDAYLIGRDHLGIIPLYMGYDEHGQLY	156
CapC	VD---PRAANLLDRASIDWNLDYLIEFACTQFGPLDETPFA-SVRVVPVPCALVVGPDG-	183
McjC	VSDKISDIKFLNPDMT-----FSLNITMAEHYLSNRIA-TQESL	140
AsnB	VA---SEMKAIVPVC-----TIKEFPAGSYLW-SQDGE	187
CapC	-RCAIERAWLPRAQA-----AGDVRASC--AAAL-DDVYSRI--AHSHPNVCAA	226
McjC	ITGIYKVNNGEFIKFNNQLKPVLLRDEFSITKKN--NSTI-DSIIDNIEMMRDNRKIAL	197
AsnB	IRSYHHRDWFYDAV-----KDNVTDKNELRQALEDSVKSHL---MSDVPYGV	233
CapC	LSGGVDSSAGAIIFLRKALGA-----NAPLAAVHLYSTSSPDCEYERDMARVADSIGA	278
McjC	FSGGLDSALIFHTLKEGSGNK-----FCAYHFFSDESDDS-EKYFAKEYCSKYGV	245
AsnB	LSGGLDSSIIISAITKKYAAARRVEDQERSEAWWPQLHSFAVGLPGSPDLKAAQEVANHLGT	293
CapC	QLICIDIDRHLFFSER-----IV--RTEPAALNQDMLFLGIDRAVS	317
McjC	DFIS--VNKNINFNEK-----LYFNLNENSPDEIPLIFEQTDEEGE	284
AsnB	V-----HHEIHETVQEGDLAIRDVIYHIETYDVTTRASTEYMLMSRKIKAMGIK----	343
CapC	N--ALGPSSVLLIEGQGGDLLER-----AVEDANAVLDALRSNGWSFALRTAEKLAMLHN	369
McjC	GQPPIDDDLILYLCGHGGDLHIFG-----QNESELFGLDAYRSHGLMFMHKKIVEFSNLKG	337
AsnB	-----MVLISGEESLEVFEGGYLYFHKAENAKELHE-----ETVRKLLALHM	383
CapC	DSIPRILLMAAKIALRRRLFGQDAPASRQTM SRLFASYPRAAAGRSRRHAPRADAPLDE	429
McjC	KRYKDIIFSN--ISAFINTSNGCSPAKQEHVSMDMKL-----	372
AsnB	YDCARA-----NKAM-----	393
CapC	SISMLDRFVSIMTPVTD A-AYTSRLNPFYLAQPVVEAAFG LHSYDSF--DHRNDRIVLREI	486
McjC	-----ASAQFFATDYTGKINKLTFELHKNI IQHYAGLPVFSLF--NQHFDRYPVRYE	422
AsnB	-----S-AWGVEARVEFTDKKFLDVAMRINPQDKMCGNGKMEKHILREC	436
CapC	ASAHTPVDVLRRTKG-SFGIGFVKGIVSHYDAIRELIRDGV-----	527
McjC	AFQRFGSDIFWKKTKR-SSQLIFRILSGKKDELVTIKQSG-----	463
AsnB	FEAYLPASVAVRQKEQFS DGVGY-----SWIDTKEVAAQVSDQQL ETARFRFPYNTPT	491
CapC	-----LMRSGRLDEAEIEHALKAVRVGQNAAAISVALVGCVEVFCAS---WQNFVTNRHA	579
McjC	-----LIEILGINHIEIESILYENTT---TRLTMELPYILNLYR---LAKFTQLQSI	509
AsnB	SKEAYLYREIFEELFPIPSAAECVPGGPSVACSSAKAIEWDEAFKKMDDPSGRAVG VHS	551

Abbildung 5.6: Sequenzalignment von CapC mit McjC und der Asparagin Synthetase B aus *E. coli*. An der Bindung von Mg^{2+} und ATP beteiligte Aminosäuren in der Asparagin Synthetase B (AsnB) sind mit einem roten Stern markiert. Die an der Bindung der beiden Substrate Glutamin und Aspartat beteiligten Reste sind mit einem schwarzen Stern gekennzeichnet. Identische Reste sind rot, ähnliche Reste blau bzw. grau hinterlegt. Das Alignment wurde mittels T-Coffee erstellt [193,194].

Die Ergebnisse der Biokombinatorikexperimente haben gezeigt, dass eine Reifung der hybriden Vorläuferproteine durch eine Kombination der beiden Reifungsenzyme des MccJ25- und Capistruinsystems nicht möglich war. Dies deutet auf eine Protein-Protein-Interaktion der prozessierenden Enzyme hin, die für die Katalyse entscheidend ist. Vermutlich liegen die

Reifungsenzyme in einem Komplex vor, der durch eine spezifische Oberflächeninteraktion generiert wird, und daher bei Proteinen aus unterschiedlichen Systemen nicht gebildet werden kann. Ein Beispiel für die Komplexbildung von Reifungsenzymen ribosomaler Peptidantibiotika ist die Microcin B17 Synthase, die aus den Reifungsenzymen McbB, McbC und McbD besteht und die korrekte Positionierung des Vorläuferproteins sowie den Einbau von Thiazol- und Oxazolringen in das Peptidrückgrat katalysiert [200]. Eine Komplexbildung von CapB und CapC hat weitreichende Konsequenzen, da dies sowohl bei der Expression und Reinigung der Proteine als auch bei den Untersuchungen der Einzelreaktionen berücksichtigt werden müsste. Denn wenn die Bildung eines CapB/CapC-Komplexes für die Katalyse essentiell ist, könnten Einzelreaktionen lediglich durch den Einsatz von Inhibitoren der beiden aktiven Zentren beobachtet und analysiert werden. Für die putative Protease CapB wäre dabei der Einsatz verschiedener Proteaseinhibitoren denkbar. Im Falle des CapC könnte die Verwendung von Inhibitoren der Asparagin Synthetase B, die für eine Asparagin Synthetase Chemotherapie zur Behandlung von akuter lymphatischer Leukämie (ALL) diskutiert und entwickelt wurden [201], sowie von nicht hydrolysierbaren ATP-Analoga wie beispielsweise ATP γ S den Nachweis der Proteolyseprodukte von CapA erlauben.

Eine bei der Biosynthese von ribosomalen Peptiden beinahe immer involvierte Reifungsreaktion ist die Proteolyse des Vorläuferproteins, die zur Freisetzung des Kernpeptids führt. Die Mutationsanalyse der Proteaseschnittstelle von CapA identifizierte Thr27 an der P2-, sowie Gly29 (entspricht Gly1 der Lassosequenz) an der P1'-Position als kritische Reste für die Reifung des Vorläuferproteins. Eine konservative Substitution von Thr27 durch Ser wurde ebenfalls nicht toleriert. Demzufolge scheint Thr essentiell für die Wechselwirkung mit der putativen Protease CapB zu sein, wobei eine Interaktion mit der Hydroxylfunktion der Seitenkette in Form einer Wasserstoffbrücke nahe liegt. Desweiteren scheint eine Erkennung der Methylgruppe des Threonins vorzuliegen, da Ser, dem diese Methylgruppe fehlt, zu einer Inhibition der Biosynthese führt. Das Vorläuferprotein des MccJ25 enthält ebenfalls ein Threonin an der P2-Position (Abbildung 5.7), das bei einem Alaninscan des minimalen Leaderpeptids von McjA als kritischer Rest für die Lassozeptidreifung identifiziert wurde [147]. Die Spezifität von CapB und McjB scheint also neben der P1'-Position auch bezüglich der P2-Position konserviert zu sein. Die Beobachtung, dass das Threonin darüber hinaus im Vorläuferprotein von Anantin ebenfalls konserviert ist (Marcel Zimmermann, unveröffentlichte Ergebnisse), impliziert eine generell entscheidende Rolle bei der Reifung von Lassozeptiden der Klasse II.

Die Mutagenesestudien von CapA und McjA zeigten, dass Gly an der Position 1 der Lassosequenz nicht durch Cystein ersetzt werden konnte, ohne die Prozessierung zu inhibieren. Für diese Beobachtung sind zwei mögliche Ursachen denkbar. Zum einen könnte Cys1 in der Zyklisierungsreaktion nicht als Nukleophil akzeptiert werden. Zum anderen könnte die veränderte Aminosäure in der P1'-Position zu einer Nichterkennung durch Protein B führen, so dass keine Abspaltung des Kernpeptids erfolgt. In diesem Fall hätte die Natur zwei verschiedene Proteasen für die Reifung von Lassozeptiden entwickelt, eine spezifisch für Gly an der P1'-Position, die an der Biosynthese von Klasse II-Lassozeptiden beteiligt ist, und eine zweite, die das Vorläuferprotein N-terminal eines Cysteins spaltet und damit die Reifung von Lassozeptiden der Klasse I katalysiert.

Diese unterschiedliche Substratspezifität würde in einer starken Limitierung für Genshuffling-Ansätze zur Biosynthese von Hybridmolekülen resultieren.

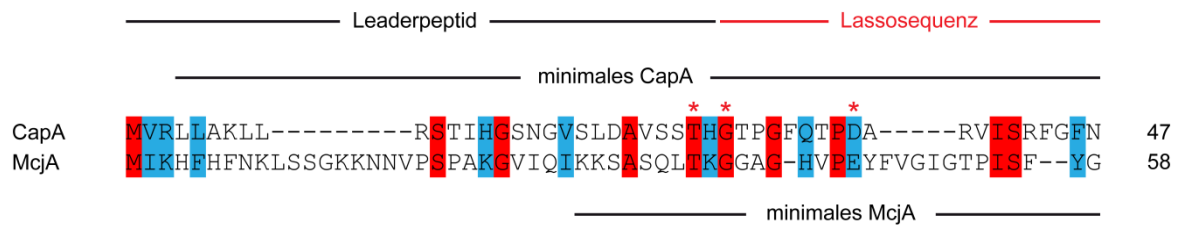


Abbildung 5.7: Sequenzalignment der Vorläuferproteine CapA und McjA. Das essentielle Thr an der P2-Position der Proteaseschnittstelle beider Vorläuferproteine, sowie das konservierte Gly an Position 1 und das Asp/Glu an Position 8 bzw. 9 der Lassosequenz, die nicht substituierbar waren, sind mit einem roten Stern hervorgehoben. Die durch N-terminale Verkürzungen identifizierten minimalen Vorläuferproteine sind gekennzeichnet. Identische Reste sind rot und ähnliche Reste blau hinterlegt. Das Alignment wurde mittels T-Coffee generiert [193,194].

Die neben der Proteolyse zweite wichtige Reifungsreaktion bei der Biosynthese von Capistruin ist die Aktivierung der Seitenkettencarboxylgruppe des Asp9. Diese Aktivierung erfolgt vermutlich durch eine Adenylierung, da für die *in vitro* Biosynthese von MccJ25 eine ATP- und Mg^{2+} -Abhängigkeit gefunden wurde [128]. Um die Spezifität dieser Adenylierung zu untersuchen, wurde die chemisch einzig sinnvolle D9E-Mutante generiert. Diese CapA-Mutante, die einer Ringerweiterung des Makrozyklus im Capistruin um eine Methylengruppe entspricht, wurde jedoch nicht in ein lassostrukturiertes Peptid konvertiert. Unter Berücksichtigung, dass die Substitution von Glu8 in MccJ25 durch Asp ebenfalls nicht toleriert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die Adenylierung sehr spezifisch für die Länge der Seitenkette ist. Folglich besteht das Repertoire zur Biosynthese von Lassozeptiden in Bakterien aus zwei Proteasen, die entweder N-terminal von Gly oder Cys spalten, und aus zwei Carboxylgruppen-aktivierenden Enzymen, die spezifisch für die Seitenkette von Asp oder Glu sind.

Die Spezifität der Biosynthesemaschinerie bezüglich einzelner Positionen der Lassosequenz wurde mit Hilfe eines Alaninscans analysiert. Dabei wurden neben dem bereits diskutierten Gly1 mit Arg11, Val12 und Ile13 drei für die Lassozeptidreifung kritische Reste identifiziert, die innerhalb des Schleifenmotivs von Capistruin lokalisiert sind. Konservative Substitutionen von Val12 und Ile13 durch Leu regenerierten die Biosynthese, wohingegen Arg11 auch nicht durch Lys substituiert werden konnte. Demzufolge ist von einer entscheidenden Funktion dieses Restes bei der Lassoreifung auszugehen. Die identifizierten vier kritischen Reste bilden zusammen mit Asp9 eine kontinuierliche Fläche auf der Oberfläche des Capistruinmoleküls, so dass eine Erkennung dieses Motivs durch die Biosynthesemaschinerie im Verlauf der Lassozeptidbildung postuliert werden kann (Abbildung 5.8). Vielleicht handelt es sich dabei um ein diskriminierendes Merkmal der Vorfaltungsreaktion, da diese kontinuierliche Fläche lediglich im Falle einer lassoartigen Struktur des linearen Peptids ausgebildet werden sollte. Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang, dass auch die kritischen Reste der MccJ25-Biosynthese eine kontinuierliche Fläche auf der Moleküloberfläche bilden, die ebenfalls einer lassoanalogen Vorfaltung bedarf [146].

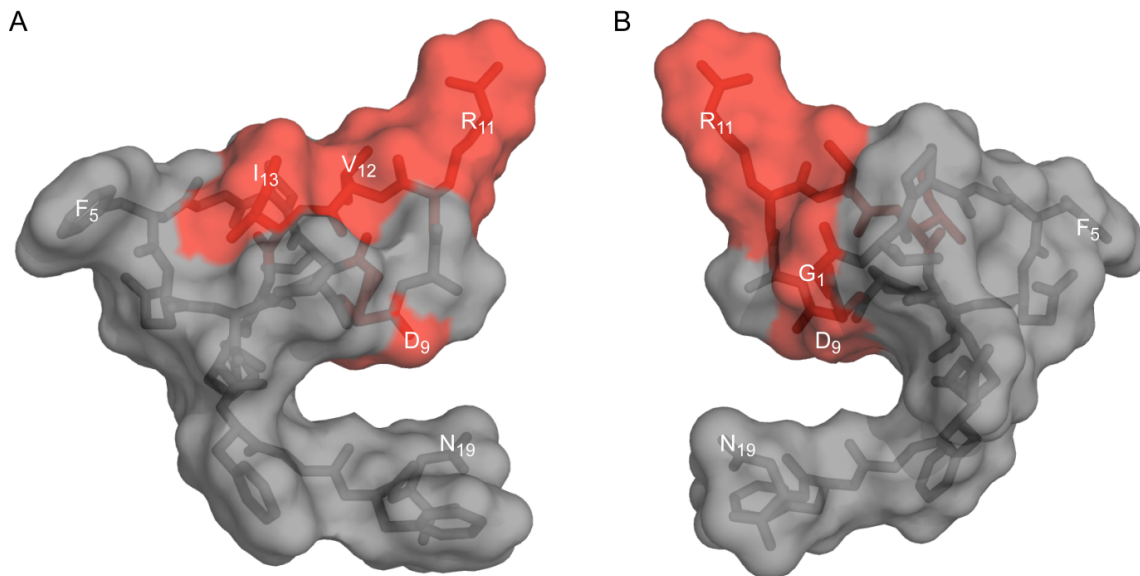


Abbildung 5.8: Position der für die Biosynthese von Capistruin kritischen Aminosäuren. (A) NMR-Struktur von Capistruin. Die lösungsmittelzugängliche Oberfläche ist in transparentem grau gezeigt. Für die Reifung des Lasso-peptids kritische Aminosäuren (Gly1, Asp9, Arg11, Val12 und Ile13) sind rot hervorgehoben. (B) Abgeleitet aus (A) durch eine 180°-Drehung um die y-Achse.

Mit Thr2 bis Pro8 konnten dagegen alle Aminosäuren des Rings, die nicht an der Zyklisierungsreaktion beteiligt sind, sowie alle Reste innerhalb des linearen C-Terminus, die innerhalb oder unterhalb des Makrozyklus positioniert sind (Ser14-Asn19) durch Alanin unter Bildung von lassostrukturierten Capistruinvarianten substituiert werden. Die Prozessierung des Vorläuferproteins wurde demzufolge durch Alaninsubstitutionen an diesen Positionen nicht verhindert, allerdings zeigten die Mutationen einen Einfluss auf die Produktionsmenge des Lasso-peptids, da die Ausbeuten teilweise signifikant unter denen des Wildtyps lagen. Unter der Annahme, dass das heterologe Expressionssystem eine vergleichbare Transkription und Translation der CapA-Varianten erlaubte, deutet dies auf eine reduzierte Erkennung und langsamere Umsetzung der Varianten durch die Biosynthesemaschinerie hin. Interessanterweise wurden alle Capistruinvarianten im Kulturüberstand nachgewiesen. Eine identische Beobachtung wurde für die MccJ25-Derivate der systematischen Struktur-Wirkungs-Analyse von Severinov *et al.* beschrieben [146]. Diese Ergebnisse deuten auf eine relaxierte Substratspezifität der Exportproteine CapD und McjD hin. Eine weitere Erklärung für die extrazelluläre Lokalisation der Varianten wäre die Präsenz eines alternativen Exportproteins.

Bei der Analyse des Einflusses des Leaderpeptids von McjA auf die Biosynthese von MccJ25 zeigte sich, dass die N-terminalen 28 Aminosäuren entfernt werden konnten, ohne die Konversion in die Lassostruktur zu inhibieren [147]. Dieses Ergebnis konnte für CapA nicht bestätigt werden. Es wurde lediglich die Entfernung der zwei N-terminalen Aminosäuren Val2 und Arg3 toleriert, wobei das Lasso-peptid daraufhin nicht mehr exportiert wurde. Diese Beobachtung deutet auf eine Rolle des Leaderpeptids beim Export des Lasso-peptids hin. Unterstützung erfährt diese Hypothese durch die Untersuchungen der Sekundärstruktur von CapA in Abhängigkeit der Lösungsmittelpolarität. Dabei wurde eine Induktion α -helikaler Strukturen durch Zugabe von SDS, also bei einer Erhöhung der

Hydrophobizität des Lösungsmittels, beobachtet. Dies könnte auf eine Wechselwirkung mit der Lipiddoppelschichtmembran und damit auf eine Leaderpeptid-basierte Kolokalisierung mit dem Exporter CapD hindeuten.

Unter Berücksichtigung der Homologievergleiche, der Ergebnisse der Mutationsanalysen sowie der Erkenntnisse, die bei den Biosynthesestudien des MccJ25 gesammelt wurden [128,130,131,202], kann ein Schema zur Biosynthese von Capistruin postuliert werden (Abbildung 5.9). Zunächst wird das Vorläuferprotein CapA ribosomal synthetisiert. CapC adenyliert in einer ATP- und Mg^{2+} -abhängigen Reaktion die Seitenkettencarboxylgruppe von Asp9 und ist dabei spezifisch für die β -Carboxylfunktion, da eine D9E-Substitution nicht toleriert wird. CapB erkennt das TXG-Motiv der Proteaseschnittstelle innerhalb des Vorläuferproteins von CapA und hydrolysiert die Peptidbindung N-terminal des Glycins, wodurch mit der α -NH₂-Gruppe das Nukleophil der Makrozyklisierungsreaktion generiert wird. Durch Substitutionen des Threonins oder Glycins wird diese Proteolysereaktion inhibiert. Der anschließenden Makrolaktambildung durch den nukleophilen Angriff der N-terminalen Aminogruppe auf die als Adenylat aktivierte Carboxylfunktion von Asp9 geht eine Vorfaltung des 19-AS Peptids voraus, da das Hindurchfädeln des C-Terminus nach erfolgtem Ringschluss sterisch nicht möglich ist und demzufolge die lassoartige Struktur vorher gebildet werden muss. Das lassostrukturierte, gereifte Peptid wird anschließend durch den ABC-Transporter CapD ins Medium sekretiert. Durch den Export wird die intrazelluläre Konzentration des Capistruins gering gehalten und damit eine Immunität des Produzenten gewährleistet. Die Reihenfolge der Teilreaktionen ist hier zur Vereinfachung sequentiell beschrieben und dargestellt. Wahrscheinlich erfolgen diese aber beinahe zeitgleich. Die beiden Reifungsenzyme CapB und CapC agieren vermutlich in Form eines Komplexes und erkennen das Vorläuferprotein bzw. die Lassosequenz anhand der für die Konversion als essentiell identifizierten Fläche, die von Gly1, Asp9, Arg11, Val12 und Ile13 auf der Moleküloberfläche gebildet wird. Die Ausbildung dieser Struktur ist dabei eventuell der Seitenkettenaktivierung vorgeschaltet und verhindert somit die Synthese von verzweigt-zyklischen, nicht lassostrukturierten Syntheseprodukten. Bei der Vorfaltung, die zur Bildung des kritischen Epitops führt, liegt eine assistierende Funktion der Reifungsenzyme nahe, da bei NMR-spektroskopischen Strukturuntersuchungen des linearen 19-AS Kernpeptids von Capistruin eine *random coil* Struktur und damit keine Strukturpräferenz zu beobachten war.

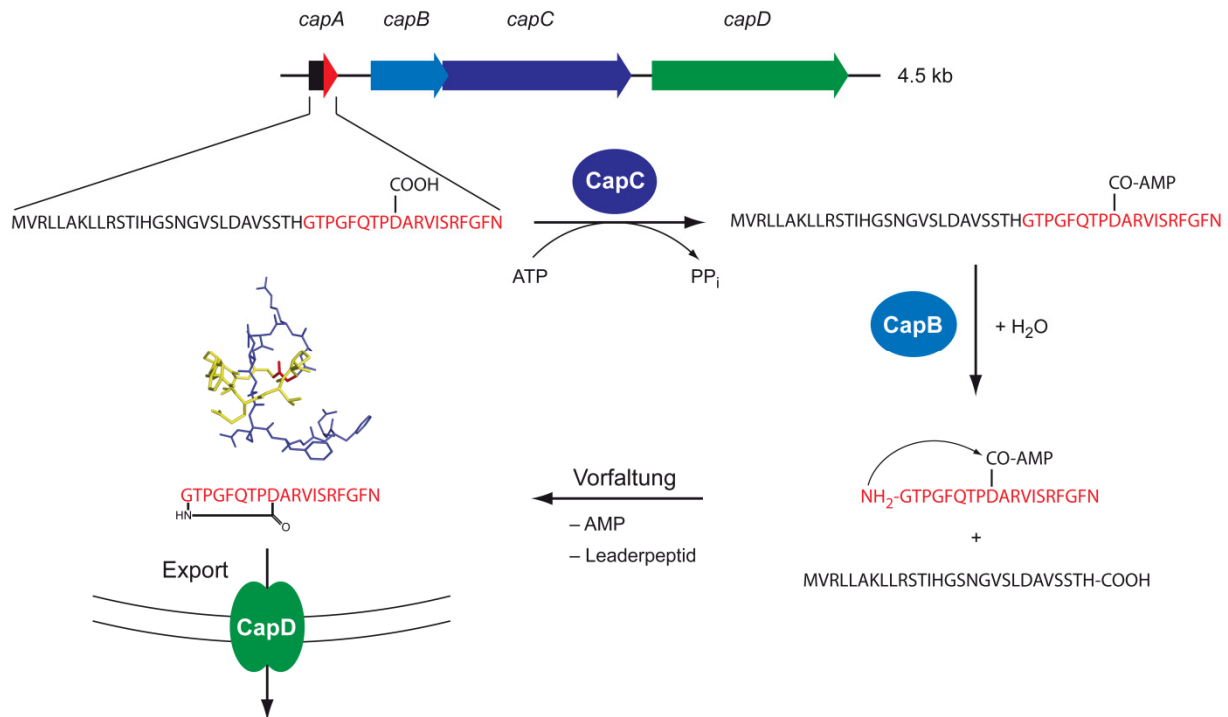


Abbildung 5.9: Postulierte Biosynthese von Capistruin. Das zur Asparagin Synthetase homologe CapC aktiviert die Seitenkettencarboxylgruppe von Asp9 der Lassosequenz (rot) durch Adenylierung. Die putative Protease CapB spaltet hydrolytisch das ribosomale Vorläuferprotein CapA in das Leaderpeptid (schwarz) und die Lassosequenz, wodurch die N-terminale Aminogruppe des Gly1 freigesetzt wird. Nach einer Vorfaltung der Lassosequenz in eine lassoartige Struktur reagiert die freigesetzte NH_2 -Gruppe als Nukleophil in der anschließenden Makrozyklisierungsreaktion unter Bildung von Capistruin, das durch den Exporter CapD aus der Zelle transportiert wird. Die Reihenfolge der beiden Reifungsreaktionen kann auch in umgekehrter Reihenfolge stattfinden.

5.1.5 Biologische Aktivität von Capistruin

Die biologische Aktivität von Lassozeptiden ist sehr unterschiedlich. Capistruin zeigte in Analogie zu MccJ25 eine antibakterielle Aktivität gegen nahe verwandte Stämme, darunter alle untersuchten *Burkholderia*-Stämme mit MICs zwischen 12 und 150 μM . Bakterien, die sensitiv gegenüber MccJ25 waren [124,140], konnten in ihrem Wachstum nicht gehemmt werden. Folglich zeigen Capistruin und MccJ25 ein unterschiedliches Wirkungsspektrum. Die Tatsache, dass beide Peptide gegen nahe verwandte Stämme aktiv sind, impliziert eine vorteilsvermittelnde Funktion bei der Konkurrenz innerhalb des gleichen Habitats. Das intrazelluläre Zielmolekül von MccJ25 in gramnegativen Bakterien ist die RNA-Polymerase [115,116,144,145]. Da für Siamycin ebenfalls eine Inhibition der RNA-Polymerase von *Streptomyces* gefunden wurde (Konstantin Severinov, persönliche Mitteilung), könnte es sich dabei um ein generelles Zielmolekül von Lassozeptiden handeln. Analysen zur Inhibition der RNA-Polymerase von *Pseudomonas*- und *Burkholderia*-Stämmen durch Capistruin werden momentan in Zusammenarbeit mit Prof. Severinov durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden zeigen, ob Lassoptide mit der RNA-Polymerase ein gemeinsames Zielprotein in den sensitiven Stämmen besitzen.

Capistruin zeigte eine signifikante Aktivität gegen *Burkholderia cepacia*, *B. multivorans*, *B. ubonensis*, *B. vietnamensis*, *B. dolosa*, *B. anthina* und *B. pyrocinia*, die als Mitglieder des *Burkholderia cepacia*-Komplexes opportunistische Infektionen beispielsweise bei Patienten mit Zystischer Fibrose verursachen [203-205]. Da Vertreter dieses Komplexes natürlicherweise resistent gegen Aminoglycoside und Polymyxin B sind, ist die Suche nach neuen Antibiotika zur Behandlung infizierter Patienten essentiell [206,207]. Capistruin könnte aufgrund seiner moderaten Aktivität gegen viele Vertreter des Komplexes als gute Leitstruktur zur Entwicklung potenter Derivate dienen. Eine Analyse der bisher hergestellten Varianten sollte dafür eine gute Ausgangsbasis darstellen und eine schnelle Identifizierung der für die biologische Aktivität kritischen Positionen erlauben.

5.1.6 Homologe Gencluster in *Burkholderia*-Stämmen

Durch Homologiesuche wurde das in *B. thailandensis* E264 identifizierte *capABCD*-Gencluster auch in nahe verwandten *Burkholderia*-Stämmen identifiziert (Abbildung 5.10). Dabei fällt auf, dass das Vorläuferprotein CapA sehr stark konserviert ist, da lediglich zwei Substitutionen, und zwar L4F und N17H, gefunden wurden (Abbildung 5.11). Beide Mutationen befinden sich im Leaderpeptid und haben daher keinen Einfluss auf die Primärstruktur des Lassozeptids. Interessanterweise ist in *Burkholderia mallei* der Exporter CapD nicht vorhanden. Dies wirft die Frage auf, ob dieser Stamm trotz der Abwesenheit des vermeintlichen Immunitätsproteins in der Lage ist, Capistruin zu produzieren. Vielleicht liegt auch analog zu YojI in *E. coli* ein alternativer Exporter vor, der die Sekretion des Lassozeptids übernimmt [139].

Die Identifizierung von Capistruinclustern in *B. mallei* und *B. pseudomallei* ist sehr interessant, da beide als Erreger von Rotz bzw. Melioidose pathogen sind und als waffenfähige biologische Kampfstoffe eingeordnet werden [208,209]. Obwohl das antibakterielle Wirkspektrum sich auf nahe verwandte *Burkholderia*-Stämme konzentriert, deutet die Präsenz des Genclusters auf eine Immunität der beiden Pathogenen gegenüber Capistruin hin, so dass das Lassozeptid als mögliches Antibiotikum nicht in Betracht zu ziehen ist.

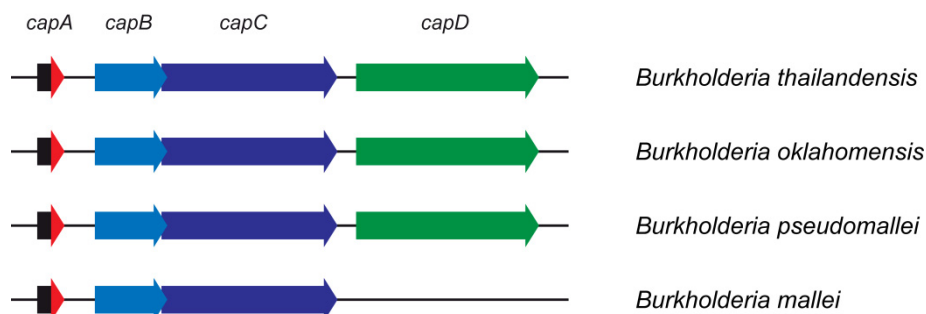


Abbildung 5.10: Konservierung des Capistruinbiosynthesekusters in *Burkholderia* Spezies. *capABCD*-Cluster sind konserviert in *B. oklahomensis* und *B. pseudomallei*. Dem homologen Cluster in *B. mallei* fehlt das Exportergen *capD*.

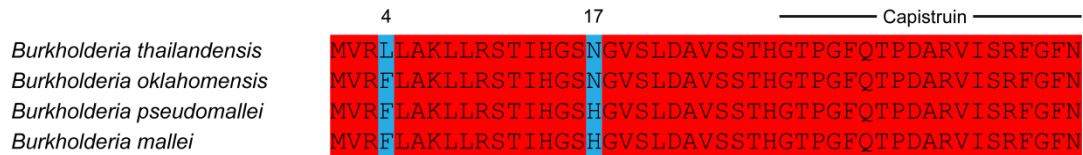


Abbildung 5.11: Sequenzalignment von CapA mit den homologen Vorläuferproteinen anderer *Burkholderia* Spezies. Die Vorläuferproteine sind stark konserviert. Lediglich an den Positionen Leu4 und Asn17 sind konservative Substitutionen durch Phe bzw. His zu finden. Innerhalb der Capistruinsequenz liegen keine Mutationen vor. Identische Reste sind rot, ähnliche Reste blau hinterlegt. Das Alignment wurde mittels T-Coffee erstellt [193,194].

5.2 Das Klasse III-Lassopeptid BI-32169

Für den Glucagonrezeptorantagonisten BI-32169 [121] wurde aufgrund seiner Ähnlichkeit mit der Primärstruktur von Lassopeptiden der Klassen I und II eine Lassostruktur postuliert. Diese Hypothese konnte mit Hilfe von massenspektrometrischen und NMR-spektroskopischen Strukturuntersuchungen verifiziert werden. Dabei stellt BI-32169 mit Glycin an Position 1 und zwei Cysteinen, die eine Disulfidbindung ausbilden, eine Mischform der Klassen I und II dar, so dass eine Einordnung in eine der beiden Klassen nicht sinnvoll erschien. Daher wurde BI-32169 als Begründer der neuen Klasse III von Lassopeptiden definiert (Abbildung 5.12).

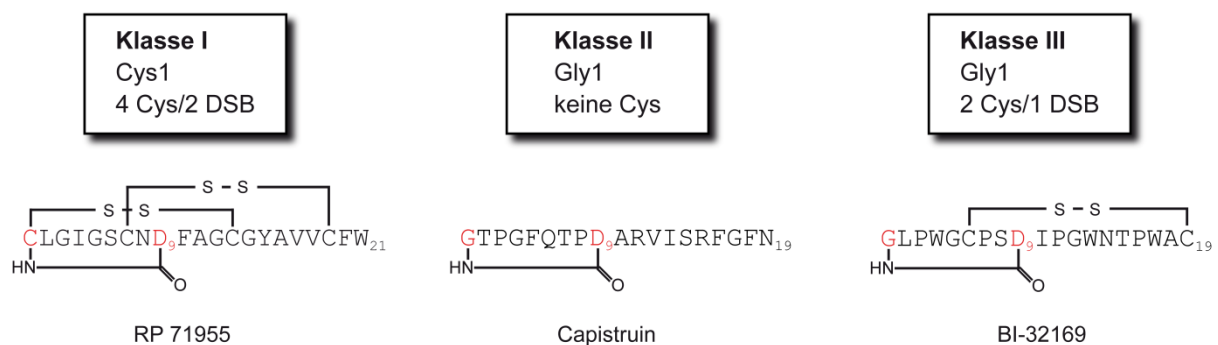


Abbildung 5.12: Neues Klassifizierungsschema bakterieller Lassopeptide. Klasse I-Lassopeptide zeichnen sich durch ein Cystein an Position 1, sowie durch 4 Cysteine insgesamt aus, die nach Oxidation zwei Disulfidbrücken bilden. Dabei sind jeweils ein Cystein des Rings und eines des C-Terminus verbunden, was zugleich in einer kovalenten Fixierung der Lassostruktur resultiert. Lassopeptide der Klasse II haben ein N-terminales Glycin gemeinsam und besitzen keine Cysteine. Die Verankerung des hindurch gefädelt C-Terminus erfolgt nicht kovalent, sondern durch sterische Hinderung voluminöser Seitenketten. Die neue Klasse III vereint Eigenschaften der Klassen I und II, da ein N-terminales Glycin sowie 2 Cysteine vorliegen, die durch eine Disulfidbindung den Ring und C-Terminus kovalent verbinden und damit die Lassoform stabilisieren.

Bei der Tandem-massenspektrometrischen Analyse des nativen Peptids dominierte die Serie, die Peptidbindungsbrüche N-terminal von Pro11 beinhaltet. Generell werden Bindungsbrüche auf der N-terminalen Seite von Prolinen überproportional oft beobachtet und resultieren in Fragmentionen mit hoher Intensität [175]. Daher ist hervorzuheben, dass im Falle des nativen BI-32169 Fragmentionen, die aus Bindungsbrüchen N-terminal von Pro16 resultierten, in deutlich geringeren Ausbeuten erhalten wurden. Diese Diskrepanz zwischen Pro11 und Pro16 kann vermutlich mit einer geringeren Zugänglichkeit bzw. Abschirmung der Peptidbindung zwischen Thr15 und Pro16 erklärt werden, die sich unmittelbar unterhalb des Makrozyklus befindet. Interessanterweise ist diese Tendenz auch im Fragmentierungsverhalten des reduzierten BI-32169 zu beobachten gewesen. Darüber hinaus zeigte das reduzierte Peptid ein schwaches Fragmentierungsverhalten wie es für Lassopeptide der Klasse II beschrieben wurde. Es konnte nach der Reduktion in die native Struktur reoxidiert werden und ein Erhitzen der reduzierten Probe führte nicht zu einem zusätzlichen chromatographischen Signal, wie für die beiden temperatursensitiven Capistruinvarianten R15A/F16A und R15K/F16A/F18A beobachtet wurde. Aus der Summe dieser Eigenschaften kann

daher auf eine stabile Lassostruktur des reduzierten BI-32169 geschlossen werden. Der einzige Widerspruch besteht in der Labilität gegenüber Carboxypeptidase Y, die ansonsten nicht in der Lage war, lassostrukturierte Peptide um mehr als zwei C-terminale Aminosäuren abzubauen. Allerdings ist fragwürdig, ob die Sensitivität gegenüber einer Carboxypeptidase als Ausschlusskriterium für eine Lassostruktur gelten kann. Vermutlich spricht eher die Stabilität gegenüber einer Carboxypeptidase für eine Lassoform und nicht umgekehrt.

In nativem BI-32169 ist der durch den N-terminalen Makrolaktamring hindurch gefädelt C-Terminus durch die Disulfidbrücke zwischen Cys6 und Cys19 an den makrozyklischen Ring gebunden, so dass eine Entfaltung der Lassostruktur durch diese kovalente Bindung verhindert wird. Es ist mit Thr15 und Pro16 keine sterisch anspruchsvolle Aminosäure direkt unterhalb der Ringebene positioniert, wie es beispielsweise in MccJ25 und Capistrin zu beobachten ist [109,122,123,181,182]. Aufgrund der Disulfidbrücke ist eine analoge sterische Fixierung zur Stabilisierung der Lassostruktur auch nicht notwendig (Abbildung 5.13A). In der reduzierten Form ist diese kovalente Bindung allerdings nicht mehr vorhanden, so dass es einer sterischen Verankerung zur Beibehaltung der Lassostruktur bedarf (Abbildung 5.13B). Diese Rolle wird vermutlich durch die sterisch anspruchsvolle Aminosäure Trp17 übernommen, die im linearen C-Terminus lokalisiert ist und nach der Reduktion der Disulfidbindung den C-terminalen Schwanz im Ring nicht-kovalent verankert. Diese Funktion könnte eine wichtige Rolle bei der Biosynthese von BI-32169 spielen, denn in der Regel werden Disulfidbindungen in Prokaryoten aufgrund des reduzierenden Milieus innerhalb des Cytoplasmas extrazellulär gebildet, so dass die sterische Verankerung durch Trp17 notwendig wäre, um eine Entfaltung der Lassostruktur in der reduzierten intrazellulären Form zu verhindern (Abbildung 5.14). Damit würde Trp17 als eine Art Sicherheitsschloss der Lassostruktur bis zur oxidativen Bildung der Disulfidbindung fungieren.

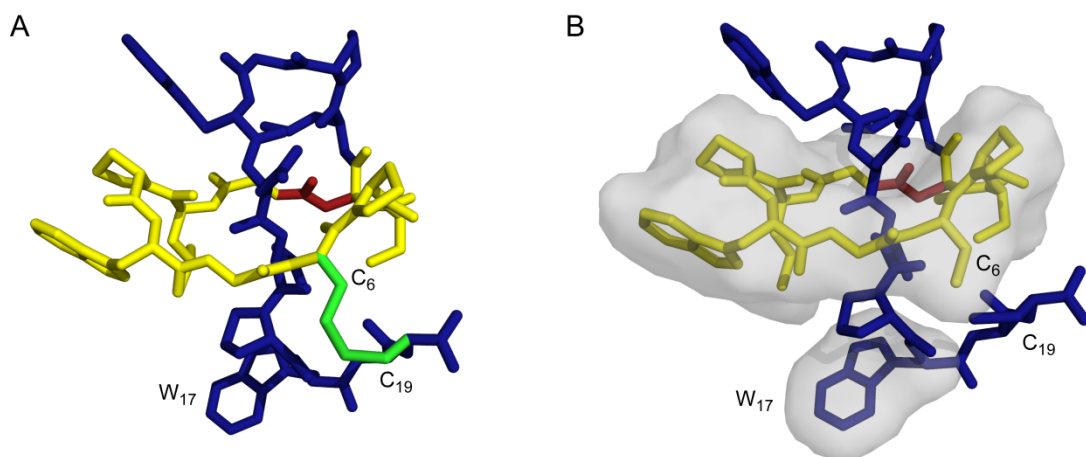


Abbildung 5.13: Stabilisierung der Lassostruktur des nativen und reduzierten BI-32169. (A) NMR-Struktur von BI-32169. Die Disulfidbindung zwischen Cys6 und Cys19 (grün) bindet den hindurch gefädelten C-Terminus (blau) kovalent an den N-terminalen Makrolaktamring (gelb, Isopeptidbindung rot). (B) In reduziertem BI-32169 ist diese kovalente Verankerung nicht präsent, so dass vermutlich die voluminöse Seitenkette des Trp17 zu einer nicht-kovalenten, sterischen Fixierung des C-Terminus führt.

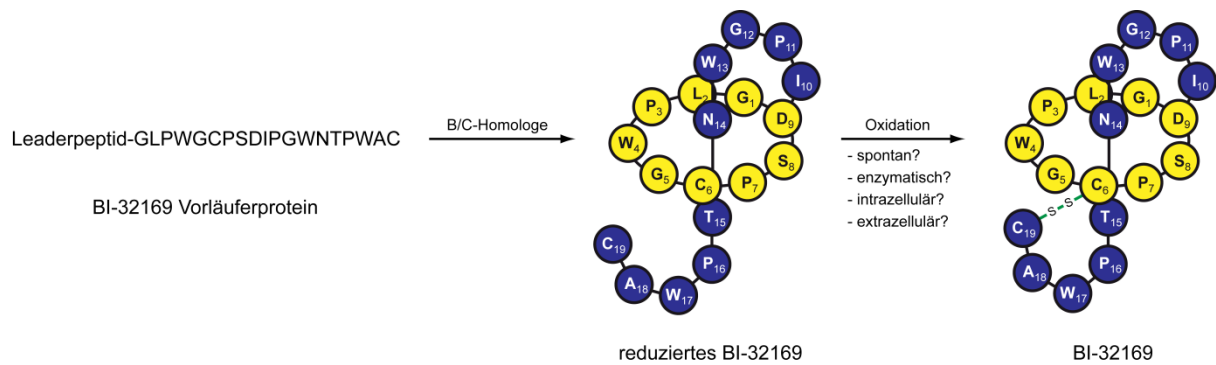


Abbildung 5.14: Postulierte Biosynthese von BI-32169. Zu CapB und CapC homologe Proteine konvertieren das Vorläuferprotein von BI-32169 in das lassostrukturierte reduzierte Peptid, das einem Klasse II-Lassozeptid entspricht. Dabei wird eine stabile Verankerung des C-Terminus innerhalb des Rings durch Trp17 realisiert. Anschließend erfolgt entweder spontan (extrazellulär) oder enzymatisch (intra- oder extrazellulär) die oxidative Ausbildung der Disulfidbrücke, woraus das native Klasse III-Lassozeptid BI-32169 hervorgeht.

Die vielversprechende und gefragte Bioaktivität von BI-32169 machen das Peptid zu einem interessanten Molekül mit Leitstrukturpotential. Der Beweis der postulierten Lassostruktur eröffnet darüber hinaus neue Wege zur Derivatisierung. In einem US-Patent, das die Verwendung von BI-32169 sowie dessen Derivaten zur Inhibition des Glucagonrezeptors beschreibt, wurde die Festphasenpeptidsynthese (engl. solid phase peptide synthesis, SPPS) der bizyklischen Verbindungen patentiert [210]. Unter Berücksichtigung der Lassostruktur, die mit Sicherheit essentiell für die biologische Funktion ist, und der Tatsache, dass bisher kein lassostrukturiertes Peptid mittels SPPS aufgrund des Faltungsproblems synthetisiert werden konnte, wird auf diesem Wege die Produktion von BI-32169 und Varianten nicht realisierbar sein. Allerdings kann diese Limitierung durch einen *in vivo* Ansatz überwunden werden. Die bisher bekannten Lassozeptidbiosynthesecuster zeigen einen ribosomalen Ursprung des Vorläuferproteins [130,181] und Mutagenesestudien von MccJ25 und Capistruin offenbarten eine promiske Biosynthesemaschinerie, die eine *in vivo* Produktion von Lassozeptidvarianten durch mutierte Vorläuferproteine erlaubte [146,182]. Voraussetzung für diese Strategie ist die Identifizierung des Biosynthesecusters von BI-32169 in *Streptomyces* sp. Anschließend sollte mit Hilfe eines analogen *in vivo* Ansatzes die Optimierung der bereits vorhandenen, pharmakologisch relevanten Bioaktivität zu erreichen sein. Alternativ könnten durch die Insertion bioaktiver Peptidepitope neue Aktivitäten in das rigide Peptidgerüst von BI-32169 eingeführt werden.

5.3 Anantin – ein Lassopeptid der Klasse II

Für Anantin wurde eine Lassostruktur aufgrund seiner zu Lassopeptiden der Klasse II homologen Primärstruktur diskutiert [36]. Die durchgeführten Fragmentierungs- und Proteolysestudien unterstützen diese Hypothese. Anantin zeigte ein schwaches Fragmentierungsverhalten, wobei alle b- und/oder y-Fragmentationen, die aus Peptidbindungsbrüchen innerhalb des C-Terminus hervorgehen können, beobachtet wurden, so dass kein Hinweis auf binäre Komplexfragmente besteht. Die Intensität der Fragmentationen war jedoch niedrig und damit typisch für lassostrukturierte Peptide. Eine Inkubation mit Carboxypeptidase Y resultierte lediglich in der Abspaltung der C-terminalen Aminosäure Phe17 und stoppte damit bei einem 16-AS Peptid. Zusammen mit der Identifizierung eines Lassopeptidbiosyntheseclusters innerhalb des Chromosoms von *S. coeruleus* (DSM 4777), das aus dem Vorläuferprotein AnA und den beiden prozessierenden Enzymen AnB und AnC besteht (Marcel Zimmermann, unveröffentlichte Ergebnisse), kann von einer Lassostruktur des Anantins ausgegangen werden. Durch den 8-AS Makrolaktamring, der aus der Kondensationsreaktion der α -NH₂-Gruppe von Gly1 mit der β -Carboxylgruppe von Asp8 hervorgeht, besitzt Anantin den kleinsten Zyklus aller bekannten Lassopeptide der Klasse II. Die Tatsache, dass der Carboxypeptidase Y-Verdau nach der Abspaltung von Phe17 stoppt, impliziert eine Lassostruktur des Abbauprodukts. Folglich kommt im Falle des Anantins Tyr13 zur sterischen Verankerung des C-Terminus in Frage. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen Capistruin und Anantin werden zukünftige Stabilitätsstudien ausgewählter Anantinvarianten helfen, den Einfluss der Ringgröße auf die Stabilität der Lassoform und auf das Fixierungspotential voluminöser Aminosäuren näher zu analysieren.

5.4 Lasso peptide als stabile Peptidgerüste für Epitop Grafting

Die außergewöhnlichen Stabilitätseigenschaften gepaart mit der genetischen Kodierung der Vorläuferproteine, die eine Derivatisierung mittels molekularbiologischer Methoden erlaubt, machen Lasso peptide zu hervorragenden Kandidaten für Protein Engineering Ansätze [36,110,124,130,181]. Ihre bakterielle Herkunft mit den damit verknüpften Vorteilen bei der Fermentation und heterologen Genexpression erhöhen zudem ihre Attraktivität. Die Verwendung stabiler ribosomaler Peptide zur Präsentation von pharmakologisch interessanten Epitopen, das sogenannte Epitop Grafting, wurde bereits für Cyclotide etabliert und führte zur Generierung von Cyclotid-basierten Antagonisten von VEGF-A [84] und Thrombopoietin [211]. Dabei wurden die Peptide entweder durch SPPS oder durch Expression als Fusionsproteine und nachfolgender Bromcyanspaltung generiert und anschließend *in vitro* zyklisiert und oxidativ gefaltet. Im Gegensatz dazu sollte für Lasso peptide ein vollständig *in vivo* ablaufender, fermentativer Ansatz entwickelt werden. Dazu wurde das Integrin bindende RGD-Epitop als pharmakologisch aktive Sequenz ausgewählt, um die Übertragbarkeit des Konzeptes auf Lasso peptide zu evaluieren.

Die RGD-Sequenz konnte dabei nicht erfolgreich in das Schleifenmotiv von Capistrin eingebaut werden, was aufgrund der Sensitivität gegenüber Substitutionen in diesem Bereich des Moleküls zu erwarten war [182]. Dagegen wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Einzelmутanten von Severinov *et al.* [146] die Insertion des Epitops in die β -Haarnadelstruktur von MccJ25 toleriert und führte zur Bildung eines lassostrukturierten Peptids wie anhand des prototypischen Fragmentierungsverhaltens gezeigt werden konnte. Die RGD-Variante des MccJ25 war fermentativ zugänglich und konnte mit einer Ausbeute von 0.5 mg/L Kultur aus *E. coli* durch eine Kombination aus Festphasenextraktion und präparativer HPLC zur Homogenität gereinigt werden. *In vitro* Bindungsstudien zeigten mit IC_{50} -Werten von 17.2 nM und 169.4 nM für $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ Integrine eine hohe Affinität des MccJ25 RGD. Damit wurde für das Lasso peptide im Vergleich zum Referenzpeptid Cilengitid, das sich momentan als Angiogenesehemmer zur Behandlung von Glioblastomen in klinischer Phase III befindet [212,213], eine etwa um den Faktor 20 bzw. 10 geringere Affinität beobachtet [163,164].

Besonders hervorzuheben ist, dass MccJ25 keine Affinität zeigte. Demzufolge wurde durch die Insertion des RGD-Motivs eine vollständig neue Bioaktivität in das stabile Peptidgerüst des Lasso peptides eingeführt. *In vivo* Angiogenesestudien mit HUVECs zeigten, dass MccJ25 RGD die Ausbildung von Gefäßen ab einer Konzentration von 10.9 $\mu\text{g/mL}$ reduzieren konnte. Im Gegensatz dazu wurde keine antiproliferative Wirkung des Peptids bis zu einer Konzentration von 125 $\mu\text{g/mL}$ beobachtet. Folglich erlaubt MccJ25 RGD eine spezifische Hemmung der Angiogenese, ohne die Vitalität der Zellen zu beeinflussen. Da Integrine des Typs $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ mit Tumorangiogenese in Verbindung gebracht werden, bestätigen die *in vivo* Daten eindeutig die *in vitro* beobachtete Affinität. Das bei den *in vitro* Bindungsstudien überlegene Cilengitid zeigte mit einer minimalen effektiven Konzentration von 10 $\mu\text{g/mL}$ bei den Angiogenesestudien *in vivo* eine zu MccJ25 RGD vergleichbare Aktivität. Interessanterweise wurde für das Heptapeptid Ac-FVRGDTP-NH₂, das der Peptidsequenz innerhalb des β -Schleifenmotivs von MccJ25 RGD entspricht, *in vitro* eine lediglich

zweifach geringere Affinität für das $\alpha_v\beta_3$ Integrin beobachtet. *In vivo* erwies sich das lineare Peptid dagegen als wirkungslos. Diese Diskrepanz könnte auf den stabilisierenden Effekt des Peptidgerüsts zurückzuführen sein. Das Lassozeptid ist aufgrund seiner Stabilität gegenüber proteolytischem Abbau in der Lage, die *in vitro* beobachtete Affinität für Integrine in einen physiologischen Effekt *in vivo* zu transformieren, während das proteolyselabile lineare Heptapeptid lediglich in der Abwesenheit von Proteasen stabil ist und eine produktive Wechselwirkung zeigt.

Die Konversion des inaktiven MccJ25 in einen nanomolaren Integrininhibitor mit anti-angiogenetischer Wirkung durch Insertion des RGD-Epitops verdeutlicht eindrucksvoll das Potential von Lassozeptiden als stabile Peptidgerüste zur Präsentation von Pharmakophoren. Aktuelle Strukturuntersuchungen von MccJ25 RGD werden Einblicke in die Geometrie des RGD-Epitops innerhalb des Lassogerüsts liefern und können als Grundlage zu einer weiteren Optimierung der *in vitro* und *in vivo* Aktivität verwendet werden.

5.5 Genomisches Mining von Lassozeptiden – Identifizierung kryptischer Gencluster

Die Isolierung von Capistruin zeigt zweifelsfrei, dass neue Lassoptide durch Genomisches Mining von bakteriellen Genomen gewonnen werden können. Dabei ist die Identifizierung von CapB/McjB-Homologen mit Hilfe von BLAST-Analysen möglich. Eine Untersuchung der flankierenden Bereiche des identifizierten Proteins liefert in der Regel Homologe zu CapC/McjC und CapD/McjD, wobei das *anABC*-Gencluster, das vermutlich für die Biosynthese von Anantin kodiert, deutlich macht, dass ein Exporter nicht zwangsläufig vertreten sein muss (Marcel Zimmermann, unveröffentlichte Ergebnisse). Neben der initialen Identifizierung der Gene, die für Reifungs- und Transportproteine kodieren, ist die Identifizierung des Vorläuferproteins und korrekte Vorhersage der Lassosequenz für die massenspektrometrisch gestützte Lassozeptidsuche entscheidend. Die Ergebnisse der Mutationsanalysen der beiden Vorläuferproteine McjA [146,147] und CapA [182] liefern jetzt eine solide Basis, um die Kriterien zur Identifizierung putativer Vorläuferproteine in kryptischen Lassozeptidclustern weiter zu optimieren. Unter Berücksichtigung dieser Resultate können folgende Anforderungen an Lassozeptidvorläuferproteine formuliert werden:

- (I) Die Länge des Vorläuferpeptids liegt im Bereich von 30 bis 70 Aminosäuren.
- (II) Glycin oder Cystein befinden sich 15 bis 22 Aminosäuren entfernt vom C-Terminus des Peptids und repräsentieren die erste Aminosäure der Lassosequenz (Nukleophil der Makrozyklisierungsreaktion).
- (III) In einem Abstand von zwei Positionen befindet sich auf der N-terminalen Seite des Gly/Cys ein Threonin.
- (IV) An Position 8 oder 9 der Lassosequenz (bezogen auf Gly1/Cys1) liegt ein Aspartat oder Glutamat vor (Elektrophil der Makrozyklisierungsreaktion).
- (V) Im C-terminalen Bereich (ab Position 13 der Lassosequenz) ist eine sterisch anspruchsvolle Aminosäure (Phe, Tyr, Trp, Arg) zu finden.

Ein Genomisches Mining, bei dem die optimierten Kriterien berücksichtigt wurden, führte zur Identifizierung von sechs kryptischen Lassozeptidclustern in Bakterien (Abbildung 5.15). Vier dieser Cluster enthalten neben den prozessierenden Enzymen auch einen ABC-Transporter, wohingegen dieser in den Clustern von *Asticacaulis excentricus* und *Caulobacter segnis* nicht vorhanden ist, was kein Nachteil für die Funktionalität bedeuten muss. In *Streptomyces* HK1 und *Caulobacter segnis* wurden sogar mehrere Vorläuferproteine identifiziert, die den Anforderungen entsprechen. Mit Ausnahme des Clusters in *S. sviveus*, der für die Produktion eines Klasse I Vertreters kodieren sollte, scheinen alle für die Biosynthese von Lassozeptiden der Klasse II verantwortlich zu sein (Abbildung 5.16).

Die Suche nach den postulierten Lassozeptiden wird zeigen, ob die identifizierten kryptischen Gencluster funktional sind und damit die Biosynthese von neuen lassostrukturierten Peptiden katalysieren. Dabei wird die Isolierung neuer Vertreter das Wissen über diese einzigartigen Naturstoffe erweitern und somit zu einer weiteren Optimierung des Genomischen Minings von Lassozeptiden beitragen.

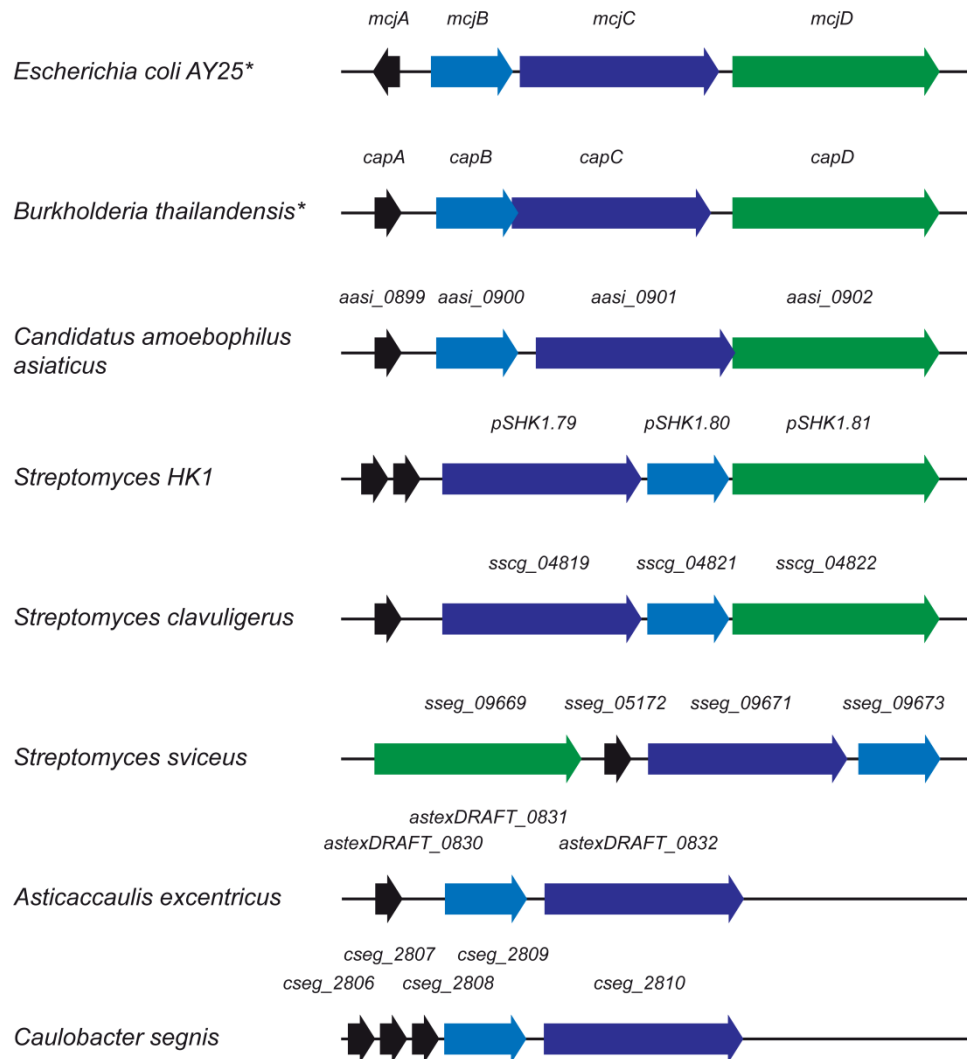


Abbildung 5.15: Bekannte und putative Lassopeptidobiosynthesescluster in Bakterien. Die bekannten, für die Biosynthese von MccJ25 und Capistrin verantwortlichen Gencluster sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die übrigen putativen Cluster wurden mittels Genomischen Minings identifiziert. Gene ohne *locus tag* sind nicht annotiert und wurden manuell gefunden. Das für den Vorläufer kodierende Gen ist schwarz, Gene für die beiden prozessierenden Enzyme blau und das Exportergen grün markiert.

	Leaderpeptid	Lassosequenz
<i>Escherichia coli</i> AY25*	MIKHFFHNKLSGKKNVPSPAKGVIIKKSASQL	TKGGAGHVP-EYFGIGTPISFYG
<i>Burkholderia thailandensis</i> *	MVRLAKLLRSTIHGSNGVSLDAVSS	THGTPGFQTPDARVISRFGFN
<i>Candidatus amoebophilus asiaticus</i>	MYKNKFERLLGLHLNNSLEYDNYGKVLTSKGASSL	TRGDDNCIT-ENTTPPNWMSSTW
<i>Streptomyces</i> HK1	MTPEIHDDSMPLHTEPVDEV	TLGRGTETR-EATHTYDMV
<i>Streptomyces</i> HK1	MQNIAIETTAPEVPALVIEPVDEI	TLGRQSFNDSDKSNYFEN
<i>Streptomyces clavuligerus</i>	MPRTRSPRHREPTVPLRSSRCLSPSPSRDRPSGVCRS	TLGRLPNDDADKSGAMYFT
<i>Streptomyces sviveus</i>	MLISTTNGQGTPTSTDELYEAPELIEIGDYAEL	TRCVWGGDCTDFLGCGTAWICV
<i>Asticcacaulis excentricus</i>	MHTPIISETVQPKTAGLIVLGKASAE	TRGLSQGVEPDIGQTYFEESRINQD
<i>Caulobacter segnis</i>	MTKKNATQAPRLVRVGDAHRL	TQGAFVGQP-EAVNPLGREIQG
<i>Caulobacter segnis</i>	MTKTHRLIRLGDAQRL	TQGTLPGLPEDFLPGHYMPG
<i>Caulobacter segnis</i>	MTSRFQLRLRGKADRL	TRGALVGLLEEDTIVARYDPM



Abbildung 5.16: Vorläuferproteine von MccJ25 und Capistrin im Vergleich mit putativen Vorläufern.

Die beiden bekannten Vorläuferproteine aus *E. coli* und *B. thailandensis* sind mit einem Stern markiert. Die übrigen Sequenzen entsprechen den in Abbildung 5.15 gezeigten putativen Vorläufern. Das Leaderpeptid ist in schwarz und die Lassosequenz in rot dargestellt. Das konservierte Threonin an der P2-Position der Proteaseschnittstelle, sowie das Nukleophil und Elektrophil der Makrozyklisierungsreaktion sind fett hervorgehoben. Mit Ausnahme des Vorläuferproteins aus *Streptomyces sviveus* kodieren alle für ein Lassozeptid der Klasse II.

5.6 Abschließende Bemerkungen

Die Resistenzentwicklung von Pathogenen ist und wird auch in Zukunft eine der wichtigen Herausforderungen für die moderne Medizin sein. Dabei können neue Naturstoffe einen wichtigen Beitrag zur Erfüllung dieser Aufgabe leisten. In zunehmendem Maß spielen bei der Isolierung von Naturstoffen rationale Strategien auf der Basis der stetig steigenden Informationsfülle sequenzierter Genome eine Rolle. Mit der Isolierung des Lassozeptids Capistrin konnte im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass auch Lassoptide mittels eines rationalen Ansatzes identifiziert werden können. Diese Naturstoffe sind für Peptide aus proteinogenen Aminosäuren außerordentlich stabil und werden durch eine Biosynthesemaschinerie mit relaxierter Substratspezifität aus einem ribosomalen und damit genetisch kodierten Vorläuferprotein synthetisiert. Durch diese Kombination sind Lassoptide für Protein Engineering Ansätze prädestiniert. Die Generierung eines nanomolaren Integrininhibitors auf der Basis des Lassozeptids MccJ25 kann als erster Beweis des bisher nicht genutzten Potentials dieser bakteriellen Peptide verstanden werden. Nichtsdestotrotz sind in der Zukunft weitere Studien insbesondere zur Biosynthese der Lassoptide notwendig, um die molekularen Abläufe im Detail zu verstehen und und das ihnen innewohnende Potential dieser einzigartigen Peptide vollständig zu erschließen.

6. Literatur

- [1] Verdine, G.L. (1996). The combinatorial chemistry of nature. *Nature* 384, 11-3.
- [2] Newman, D.J., Cragg, G.M. and Snader, K.M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 66, 1022-37.
- [3] Newman, D.J. and Cragg, G.M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 70, 461-77.
- [4] Demain, A.L. (2009). Antibiotics: natural products essential to human health. *Med Res Rev* 29, 821-42.
- [5] Singh, S.B. and Barrett, J.F. (2006). Empirical antibacterial drug discovery--foundation in natural products. *Biochem Pharmacol* 71, 1006-15.
- [6] Bode, H.B. and Muller, R. (2005). The impact of bacterial genomics on natural product research. *Angew Chem Int Ed Engl* 44, 6828-46.
- [7] Donadio, S., Monciardini, P. and Sosio, M. (2007). Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. *Nat Prod Rep* 24, 1073-109.
- [8] Corre, C. and Challis, G.L. (2009). New natural product biosynthetic chemistry discovered by genome mining. *Nat Prod Rep* 26, 977-86.
- [9] Zerikly, M. and Challis, G.L. (2009). Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. *Chembiochem* 10, 625-33.
- [10] Bentley, S.D. et al. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417, 141-7.
- [11] Scherlach, K. and Hertweck, C. (2009). Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Org Biomol Chem* 7, 1753-60.
- [12] Bode, H.B., Bethe, B., Hofs, R. and Zeeck, A. (2002). Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochem* 3, 619-27.
- [13] Udvary, D.W., Zeigler, L., Asolkar, R.N., Singan, V., Lapidus, A., Fenical, W., Jensen, P.R. and Moore, B.S. (2007). Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10376-81.
- [14] Gross, H., Stockwell, V.O., Henkels, M.D., Nowak-Thompson, B., Loper, J.E. and Gerwick, W.H. (2007). The genomisotopic approach: a systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene clusters. *Chem Biol* 14, 53-63.
- [15] McClerren, A.L., Cooper, L.E., Quan, C., Thomas, P.M., Kelleher, N.L. and van der Donk, W.A. (2006). Discovery and in vitro biosynthesis of haloduracin, a two-component lantibiotic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17243-8.
- [16] Challis, G.L. and Ravel, J. (2000). Coelichelin, a new peptide siderophore encoded by the *Streptomyces coelicolor* genome: structure prediction from the sequence of its non-ribosomal peptide synthetase. *FEMS Microbiol Lett* 187, 111-4.
- [17] Lautru, S., Deeth, R.J., Bailey, L.M. and Challis, G.L. (2005). Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Nat Chem Biol* 1, 265-9.
- [18] Nolan, E.M. and Walsh, C.T. (2009). How nature morphs peptide scaffolds into antibiotics. *Chembiochem* 10, 34-53.
- [19] McIntosh, J.A., Donia, M.S. and Schmidt, E.W. (2009). Ribosomal peptide natural products: bridging the ribosomal and nonribosomal worlds. *Nat Prod Rep* 26, 537-59.
- [20] Sieber, S.A. and Marahiel, M.A. (2005). Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chem Rev* 105, 715-38.
- [21] Marahiel, M.A. (2009). Working outside the protein-synthesis rules: insights into non-ribosomal peptide synthesis. *J Pept Sci* 15, 799-807.
- [22] Caboche, S., Pupin, M., Leclerc, V., Fontaine, A., Jacques, P. and Kucharov, G. (2008). NORINE: a database of nonribosomal peptides. *Nucleic Acids Res* 36, D326-31.
- [23] Oman, T.J. and van der Donk, W.A. (2010). Follow the leader: the use of leader peptides to guide natural product biosynthesis. *Nat Chem Biol* 6, 9-18.
- [24] Willey, J.M. and van der Donk, W.A. (2007). Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu Rev Microbiol* 61, 477-501.
- [25] Yorgey, P., Lee, J., Kordel, J., Vivas, E., Warner, P., Jebaratnam, D. and Kolter, R. (1994). Posttranslational modifications in microcin B17 define an additional class of DNA gyrase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4519-23.
- [26] Schmidt, E.W. and Donia, M.S. (2009). Chapter 23. Cyanobactin ribosomally synthesized peptides--a case of deep metagenome mining. *Methods Enzymol* 458, 575-96.

- [27] Okada, M., Sato, I., Cho, S.J., Iwata, H., Nishio, T., Dubnau, D. and Sakagami, Y. (2005). Structure of the *Bacillus subtilis* quorum-sensing peptide pheromone ComX. *Nat Chem Biol* 1, 23-4.
- [28] Bulaj, G. (2005). Formation of disulfide bonds in proteins and peptides. *Biotechnol Adv* 23, 87-92.
- [29] Bulaj, G. and Olivera, B.M. (2008). Folding of conotoxins: formation of the native disulfide bridges during chemical synthesis and biosynthesis of *Conus* peptides. *Antioxid Redox Signal* 10, 141-55.
- [30] Craik, D.J., Mylne, J.S. and Daly, N.L. (2010). Cyclotides: macrocyclic peptides with applications in drug design and agriculture. *Cell Mol Life Sci* 67, 9-16.
- [31] Lehrer, R.I. and Ganz, T. (2002). Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol* 14, 96-102.
- [32] Kawulka, K., Sprules, T., McKay, R.T., Mercier, P., Diaper, C.M., Zuber, P. and Vederas, J.C. (2003). Structure of subtilisin A, an antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual posttranslational modifications linking cysteine sulfurs to alpha-carbons of phenylalanine and threonine. *J Am Chem Soc* 125, 4726-7.
- [33] Maqueda, M., Sanchez-Hidalgo, M., Fernandez, M., Montalban-Lopez, M., Valdivia, E. and Martinez-Bueno, M. (2008). Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 32, 2-22.
- [34] Craik, D.J. (2009). Circling the enemy: cyclic proteins in plant defence. *Trends Plant Sci* 14, 328-35.
- [35] Selsted, M.E. (2004). Theta-defensins: cyclic antimicrobial peptides produced by binary ligation of truncated alpha-defensins. *Curr Protein Pept Sci* 5, 365-71.
- [36] Rebuffat, S., Blond, A., Destoumieux-Garzon, D., Goulard, C. and Peduzzi, J. (2004). Microcin J25, from the macrocyclic to the lasso structure: implications for biosynthetic, evolutionary and biotechnological perspectives. *Curr Protein Pept Sci* 5, 383-91.
- [37] Guijarro, J.I., Gonzalez-Pastor, J.E., Baleux, F., San Millan, J.L., Castilla, M.A., Rico, M., Moreno, F. and Delepierre, M. (1995). Chemical structure and translation inhibition studies of the antibiotic microcin C7. *J Biol Chem* 270, 23520-32.
- [38] Sturme, M.H., Kleerebezem, M., Nakayama, J., Akkermans, A.D., Vaughn, E.E. and de Vos, W.M. (2002). Cell to cell communication by autoinducing peptides in gram-positive bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 233-43.
- [39] Philmus, B., Christiansen, G., Yoshida, W.Y. and Hemscheidt, T.K. (2008). Post-translational modification in microviridin biosynthesis. *Chembiochem* 9, 3066-73.
- [40] Thomas, X. et al. (2004). Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity. *J Biol Chem* 279, 28233-42.
- [41] In, Y., Doi, M., Inoue, M., Ishida, T., Hamada, Y. and Shioiri, T. (1994). Patellamide A, a cytotoxic cyclic peptide from the ascidian *Lissoclinum patella*. *Acta Crystallogr C* 50 (Pt 3), 432-4.
- [42] Trabi, M. and Craik, D.J. (2002). Circular proteins--no end in sight. *Trends Biochem Sci* 27, 132-8.
- [43] Heng, N.C.K. and Tagg, J.R. (2006). What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nat Rev Micro* 4
- [44] Leer, R.J., van der Vossen, J.M., van Giezen, M., van Noort, J.M. and Pouwels, P.H. (1995). Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology* 141, 1629-35.
- [45] Galvez, A., Maqueda, M., Valdivia, E., Quesada, A. and Montoya, E. (1986). Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. *Can J Microbiol* 32, 765-71.
- [46] Kalmokoff, M.L. and Teather, R.M. (1997). Isolation and characterization of a bacteriocin (Butyrivibriocin AR10) from the ruminal anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens* AR10: evidence in support of the widespread occurrence of bacteriocin-like activity among ruminal isolates of *B. fibrisolvens*. *Appl Environ Microbiol* 63, 394-402.
- [47] Martin-Visscher, L.A., van Belkum, M.J., Garneau-Tsodikova, S., Whittall, R.M., Zheng, J., McMullen, L.M. and Vederas, J.C. (2008). Isolation and characterization of carnocyclin a, a novel circular bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. *Appl Environ Microbiol* 74, 4756-63.
- [48] Kemperman, R., Kuipers, A., Karsens, H., Nauta, A., Kuipers, O. and Kok, J. (2003). Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Appl Environ Microbiol* 69, 1589-97.
- [49] Kawai, Y., Saito, T., Kitazawa, H. and Itoh, T. (1998). Gassericin A; an uncommon cyclic bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39 linked at N- and C-terminal ends. *Biosci Biotechnol Biochem* 62, 2438-40.

- [50] Kabuki, T., Saito, T., Kawai, Y., Uemura, J. and Itoh, T. (1997). Production, purification and characterization of reuterin 6, a bacteriocin with lytic activity produced by *Lactobacillus reuteri* LA6. *Int J Food Microbiol* 34, 145-56.
- [51] Wirawan, R.E., Swanson, K.M., Kleffmann, T., Jack, R.W. and Tagg, J.R. (2007). Uberolysin: a novel cyclic bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Microbiology* 153, 1619-30.
- [52] Babasaki, K., Takao, T., Shimonishi, Y. and Kurahashi, K. (1985). Subtilisin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis. *J Biochem* 98, 585-603.
- [53] Arakawa, K., Kawai, Y., Ito, Y., Nakamura, K., Chujo, T., Nishimura, J., Kitazawa, H. and Saito, T. (2010). HPLC purification and re-evaluation of chemical identity of two circular bacteriocins, gasserin A and reuterin 6. *Lett Appl Microbiol*
- [54] Lotierzo, M., Tse Sum Bui, B., Florentin, D., Escalettes, F. and Marquet, A. (2005). Biotin synthase mechanism: an overview. *Biochem Soc Trans* 33, 820-3.
- [55] Wang, S.C. and Frey, P.A. (2007). S-adenosylmethionine as an oxidant: the radical SAM superfamily. *Trends Biochem Sci* 32, 101-10.
- [56] Frey, P.A., Hegeman, A.D. and Ruzicka, F.J. (2008). The Radical SAM Superfamily. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 43, 63-88.
- [57] Bordusa, F. (2002). Proteases in organic synthesis. *Chem Rev* 102, 4817-68.
- [58] Shelburne, C.E., An, F.Y., Dholpe, V., Ramamoorthy, A., Lopatin, D.E. and Lantz, M.S. (2007). The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilisin A. *J Antimicrob Chemother* 59, 297-300.
- [59] Thennarasu, S., Lee, D.K., Poon, A., Kawulka, K.E., Vederas, J.C. and Ramamoorthy, A. (2005). Membrane permeabilization, orientation, and antimicrobial mechanism of subtilisin A. *Chem Phys Lipids* 137, 38-51.
- [60] Silkin, L., Hamza, S., Kaufman, S., Cobb, S.L. and Vederas, J.C. (2008). Spermicidal bacteriocins: lacticin 3147 and subtilisin A. *Bioorg Med Chem Lett* 18, 3103-6.
- [61] Sutyak, K.E., Anderson, R.A., Dover, S.E., Feathergill, K.A., Aroutcheva, A.A., Faro, S. and Chikindas, M.L. (2008). Spermicidal activity of the safe natural antimicrobial peptide subtilisin. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2008, 540758.
- [62] Donia, M.S., Ravel, J. and Schmidt, E.W. (2008). A global assembly line for cyanobactins. *Nat Chem Biol* 4, 341-3.
- [63] Jones, A.C., Gu, L., Sorrels, C.M., Sherman, D.H. and Gerwick, W.H. (2009). New tricks from ancient algae: natural products biosynthesis in marine cyanobacteria. *Curr Opin Chem Biol* 13, 216-23.
- [64] Ireland, C.M., Durso, A.R., Newman, R.A. and Hacker, M.P. (1982). Antineoplastic cyclic peptides from the marine tunicate *Lissoclinum patella*. *The Journal of Organic Chemistry* 47, 1807-1811.
- [65] Schmidt, E.W., Nelson, J.T., Rasko, D.A., Sudek, S., Eisen, J.A., Haygood, M.G. and Ravel, J. (2005). Patellamide A and C biosynthesis by a microcin-like pathway in *Prochloron didemni*, the cyanobacterial symbiont of *Lissoclinum patella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7315-20.
- [66] Lee, J., McIntosh, J., Hathaway, B.J. and Schmidt, E.W. (2009). Using marine natural products to discover a protease that catalyzes peptide macrocyclization of diverse substrates. *J Am Chem Soc* 131, 2122-4.
- [67] Milne, B.F., Long, P.F., Starcevic, A., Hranueli, D. and Jaspars, M. (2006). Spontaneity in the patellamide biosynthetic pathway. *Org Biomol Chem* 4, 631-8.
- [68] Donia, M.S., Hathaway, B.J., Sudek, S., Haygood, M.G., Rosovitz, M.J., Ravel, J. and Schmidt, E.W. (2006). Natural combinatorial peptide libraries in cyanobacterial symbionts of marine ascidians. *Nat Chem Biol* 2, 729-35.
- [69] Vetter, J. (1998). Toxins of *Amanita phalloides*. *Toxicon* 36, 13-24.
- [70] Bushnell, D.A., Cramer, P. and Kornberg, R.D. (2002). Structural basis of transcription: alpha-amanitin-RNA polymerase II cocystal at 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1218-22.
- [71] Bamburg, J.R. (1999). Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 185-230.
- [72] Hallen, H.E., Luo, H., Scott-Craig, J.S. and Walton, J.D. (2007). Gene family encoding the major toxins of lethal *Amanita* mushrooms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19097-101.
- [73] Daly, N.L., Rosengren, K.J. and Craik, D.J. (2009). Discovery, structure and biological activities of cyclotides. *Adv Drug Deliv Rev* 61, 918-30.
- [74] Wang, C.K., Kaas, Q., Chiche, L. and Craik, D.J. (2008). CyBase: a database of cyclic protein sequences and structures, with applications in protein discovery and engineering. *Nucleic Acids Res* 36, D206-10.
- [75] Dutton, J.L., Renda, R.F., Waine, C., Clark, R.J., Daly, N.L., Jennings, C.V., Anderson, M.A. and Craik, D.J. (2004). Conserved structural and sequence elements implicated in the processing of gene-encoded circular proteins. *J Biol Chem* 279, 46858-67.

- [76] Saska, I., Gillon, A.D., Hatsugai, N., Dietzgen, R.G., Hara-Nishimura, I., Anderson, M.A. and Craik, D.J. (2007). An asparaginyl endopeptidase mediates in vivo protein backbone cyclization. *J Biol Chem* 282, 29721-8.
- [77] Gillon, A.D., Saska, I., Jennings, C.V., Guarino, R.F., Craik, D.J. and Anderson, M.A. (2008). Biosynthesis of circular proteins in plants. *Plant J* 53, 505-15.
- [78] Gruber, C.W., Cemazar, M., Heras, B., Martin, J.L. and Craik, D.J. (2006). Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends Biochem Sci* 31, 455-64.
- [79] Gruber, C.W., Cemazar, M., Clark, R.J., Horibe, T., Renda, R.F., Anderson, M.A. and Craik, D.J. (2007). A novel plant protein-disulfide isomerase involved in the oxidative folding of cystine knot defense proteins. *J Biol Chem* 282, 20435-46.
- [80] Gruber, C.W., Cemazar, M., Mechler, A., Martin, L.L. and Craik, D.J. (2009). Biochemical and biophysical characterization of a novel plant protein disulfide isomerase. *Biopolymers* 92, 35-43.
- [81] Craik, D.J., Clark, R.J. and Daly, N.L. (2007). Potential therapeutic applications of the cyclotides and related cystine knot mini-proteins. *Expert Opin Investig Drugs* 16, 595-604.
- [82] Huang, Y.H., Colgrave, M.L., Daly, N.L., Keleshian, A., Martinac, B. and Craik, D.J. (2009). The biological activity of the prototypic cyclotide kalata b1 is modulated by the formation of multimeric pores. *J Biol Chem* 284, 20699-707.
- [83] Colgrave, M.L. and Craik, D.J. (2004). Thermal, chemical, and enzymatic stability of the cyclotide kalata B1: the importance of the cyclic cystine knot. *Biochemistry* 43, 5965-75.
- [84] Gunasekera, S., Foley, F.M., Clark, R.J., Sando, L., Fabri, L.J., Craik, D.J. and Daly, N.L. (2008). Engineering stabilized vascular endothelial growth factor-A antagonists: synthesis, structural characterization, and bioactivity of grafted analogues of cyclotides. *J Med Chem* 51, 7697-704.
- [85] Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A. and Ezekowitz, R.A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-8.
- [86] Selsted, M.E., Brown, D.M., DeLange, R.J., Harwig, S.S. and Lehrer, R.I. (1985). Primary structures of six antimicrobial peptides of rabbit peritoneal neutrophils. *J Biol Chem* 260, 4579-84.
- [87] Diamond, G., Zasloff, M., Eck, H., Brasseur, M., Maloy, W.L. and Bevins, C.L. (1991). Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3952-6.
- [88] Tang, Y.Q., Yuan, J., Osapay, G., Osapay, K., Tran, D., Miller, C.J., Ouellette, A.J. and Selsted, M.E. (1999). A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science* 286, 498-502.
- [89] Nguyen, T.X., Cole, A.M. and Lehrer, R.I. (2003). Evolution of primate theta-defensins: a serpentine path to a sweet tooth. *Peptides* 24, 1647-54.
- [90] Cole, A.M., Wang, W., Waring, A.J. and Lehrer, R.I. (2004). Retrocyclins: using past as prologue. *Curr Protein Pept Sci* 5, 373-81.
- [91] Cole, A.M. et al. (2002). Retrocyclin: a primate peptide that protects cells from infection by T- and M-tropic strains of HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1813-8.
- [92] Yasin, B. et al. (2004). Theta defensins protect cells from infection by herpes simplex virus by inhibiting viral adhesion and entry. *J Virol* 78, 5147-56.
- [93] Leikina, E. et al. (2005). Carbohydrate-binding molecules inhibit viral fusion and entry by crosslinking membrane glycoproteins. *Nat Immunol* 6, 995-1001.
- [94] Venkataraman, N., Cole, A.L., Ruchala, P., Waring, A.J., Lehrer, R.I., Stuchlik, O., Pohl, J. and Cole, A.M. (2009). Reawakening retrocyclins: ancestral human defensins active against HIV-1. *PLoS Biol* 7, e95.
- [95] Phillips, R. (2005). Back to the past: new drugs from ancient molecules? *Nat Immunol* 6, 963-4.
- [96] Daly, N.L. et al. (2007). Retrocyclin-2: structural analysis of a potent anti-HIV theta-defensin. *Biochemistry* 46, 9920-8.
- [97] Katahira, R., Shibata, K., Yamasaki, M., Matsuda, Y. and Yoshida, M. (1995). Solution structure of endothelin B receptor selective antagonist RES-701-1 determined by ¹H NMR spectroscopy. *Bioorg Med Chem* 3, 1273-80.
- [98] Katahira, R., Yamasaki, M., Matsuda, Y. and Yoshida, M. (1996). MS-271, a novel inhibitor of calmodulin-activated myosin light chain kinase from *Streptomyces* sp.--II. Solution structure of MS-271: characteristic features of the "lasso" structure. *Bioorg Med Chem* 4, 121-9.
- [99] Yano, K., Toki, S., Nakanishi, S., Ochiai, K., Ando, K., Yoshida, M., Matsuda, Y. and Yamasaki, M. (1996). MS-271, a novel inhibitor of calmodulin-activated myosin light chain kinase from *Streptomyces* sp.--I. Isolation, structural determination and biological properties of MS-271. *Bioorg Med Chem* 4, 115-20.
- [100] Helynck, G., Dubertret, C., Mayaux, J.F. and Leboul, J. (1993). Isolation of RP 71955, a new anti-HIV-1 peptide secondary metabolite. *J Antibiot (Tokyo)* 46, 1756-7.

- [101] Tsunakawa, M. et al. (1995). Siamycins I and II, new anti-HIV peptides: I. Fermentation, isolation, biological activity and initial characterization. *J Antibiot (Tokyo)* 48, 433-4.
- [102] Choekijchai, S. et al. (1995). NP-06: a novel anti-human immunodeficiency virus polypeptide produced by a *Streptomyces* species. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 2345-7.
- [103] Detlefsen, D.J. et al. (1995). Siamycins I and II, new anti-HIV-1 peptides: II. Sequence analysis and structure determination of siamycin I. *J Antibiot (Tokyo)* 48, 1515-7.
- [104] Constantine, K.L. et al. (1995). High-resolution solution structure of siamycin II: novel amphipathic character of a 21-residue peptide that inhibits HIV fusion. *J Biomol NMR* 5, 271-86.
- [105] Potterat, O., Stephan, H., Metzger, J.W., Gnau, V., Zähler, H. and Jung, G. (1994). Aborycin - A Tricyclic 21-Peptide Antibiotic Isolated from *Streptomyces griseoflavus*. *Liebigs Annalen der Chemie* 1994, 741-743.
- [106] Lin, P.F. et al. (1996). Characterization of siamycin I, a human immunodeficiency virus fusion inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 133-8.
- [107] De Clercq, E. (2000). Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Med Res Rev* 20, 323-49.
- [108] Frechet, D. et al. (1994). Solution structure of RP 71955, a new 21 amino acid tricyclic peptide active against HIV-1 virus. *Biochemistry* 33, 42-50.
- [109] Rosengren, K.J., Clark, R.J., Daly, N.L., Goransson, U., Jones, A. and Craik, D.J. (2003). Microcin J25 has a threaded sidechain-to-backbone ring structure and not a head-to-tail cyclized backbone. *J Am Chem Soc* 125, 12464-74.
- [110] Iwatsuki, M., Tomoda, H., Uchida, R., Gouda, H., Hirono, S. and Omura, S. (2006). Lariatins, antimycobacterial peptides produced by *Rhodococcus* sp. K01-B0171, have a lasso structure. *J Am Chem Soc* 128, 7486-91.
- [111] Salomon, R.A. and Farias, R.N. (1992). Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174, 7428-35.
- [112] Morishita, Y. et al. (1994). RES-701-1, a novel and selective endothelin type B receptor antagonist produced by *Streptomyces* sp. RE-701. I. Characterization of producing strain, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* 47, 269-75.
- [113] Yamasaki, M., Yano, K., Yoshida, M., Matsuda, Y. and Yamaguchi, K. (1994). RES-701-1, a novel and selective endothelin type B receptor antagonist produced by *Streptomyces* sp. RE-701. II. Determination of the primary sequence. *J Antibiot (Tokyo)* 47, 276-80.
- [114] Iwatsuki, M. et al. (2007). Lariatins, novel anti-mycobacterial peptides with a lasso structure, produced by *Rhodococcus jostii* K01-B0171. *J Antibiot (Tokyo)* 60, 357-63.
- [115] Mukhopadhyay, J., Sineva, E., Knight, J., Levy, R.M. and Ebright, R.H. (2004). Antibacterial peptide microcin J25 inhibits transcription by binding within and obstructing the RNA polymerase secondary channel. *Mol Cell* 14, 739-51.
- [116] Adelman, K. et al. (2004). Molecular mechanism of transcription inhibition by peptide antibiotic Microcin J25. *Mol Cell* 14, 753-62.
- [117] Weber, W., Fischli, W., Hochuli, E., Kupfer, E. and Weibel, E.K. (1991). Anantin--a peptide antagonist of the atrial natriuretic factor (ANF). I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity. *J Antibiot (Tokyo)* 44, 164-71.
- [118] Wyss, D.F., Lahm, H.W., Manneberg, M. and Labhardt, A.M. (1991). Anantin--a peptide antagonist of the atrial natriuretic factor (ANF). II. Determination of the primary sequence by NMR on the basis of proton assignments. *J Antibiot (Tokyo)* 44, 172-80.
- [119] Kimura, K., Kanou, F., Takahashi, H., Esumi, Y., Uramoto, M. and Yoshihama, M. (1997). Propeptin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase produced by *Microbispora*. I. Fermentation, isolation and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* 50, 373-8.
- [120] Esumi, Y., Suzuki, Y., Itoh, Y., Uramoto, M., Kimura, K., Goto, M., Yoshihama, M. and Ichikawa, T. (2002). Propeptin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase produced by *Microbispora* - II. Determination of chemical structure. *Journal of Antibiotics* 55, 296-300.
- [121] Potterat, O., Wagner, K., Gemmecker, G., Mack, J., Puder, C., Vettermann, R. and Streicher, R. (2004). BI-32169, a bicyclic 19-peptide with strong glucagon receptor antagonist activity from *Streptomyces* sp. *J Nat Prod* 67, 1528-31.
- [122] Wilson, K.A. et al. (2003). Structure of microcin J25, a peptide inhibitor of bacterial RNA polymerase, is a lassoed tail. *J Am Chem Soc* 125, 12475-83.
- [123] Bayro, M.J. et al. (2003). Structure of antibacterial peptide microcin J25: a 21-residue lariat protoknot. *J Am Chem Soc* 125, 12382-3.

- [124] Blond, A. et al. (1999). The cyclic structure of microcin J25, a 21-residue peptide antibiotic from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 259, 747-55.
- [125] Blond, A. et al. (2001). Solution structure of microcin J25, the single macrocyclic antimicrobial peptide from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 268, 2124-33.
- [126] Rosengren, K.J., Blond, A., Afonso, C., Tabet, J.C., Rebuffat, S. and Craik, D.J. (2004). Structure of thermolysin cleaved microcin J25: extreme stability of a two-chain antimicrobial peptide devoid of covalent links. *Biochemistry* 43, 4696-702.
- [127] Blond, A., Cheminant, M., Destoumieux-Garzon, D., Segalas-Milazzo, I., Peduzzi, J., Goulard, C. and Rebuffat, S. (2002). Thermolysin-linearized microcin J25 retains the structured core of the native macrocyclic peptide and displays antimicrobial activity. *Eur J Biochem* 269, 6212-22.
- [128] Duquesne, S., Destoumieux-Garzon, D., Zirah, S., Goulard, C., Peduzzi, J. and Rebuffat, S. (2007). Two enzymes catalyze the maturation of a lasso peptide in *Escherichia coli*. *Chem Biol* 14, 793-803.
- [129] Solbiati, J.O., Ciaccio, M., Farias, R.N. and Salomon, R.A. (1996). Genetic analysis of plasmid determinants for microcin J25 production and immunity. *J Bacteriol* 178, 3661-3.
- [130] Solbiati, J.O., Ciaccio, M., Farias, R.N., Gonzalez-Pastor, J.E., Moreno, F. and Salomon, R.A. (1999). Sequence analysis of the four plasmid genes required to produce the circular peptide antibiotic microcin J25. *J Bacteriol* 181, 2659-62.
- [131] Clarke, D.J. and Campopiano, D.J. (2007). Maturation of McjA precursor peptide into active microcin MccJ25. *Org Biomol Chem* 5, 2564-6.
- [132] Griffin, M., Casadio, R. and Bergamini, C.M. (2002). Transglutaminases: nature's biological glues. *Biochem J* 368, 377-96.
- [133] Makarova, K.S., Aravind, L. and Koonin, E.V. (1999). A superfamily of archaeal, bacterial, and eukaryotic proteins homologous to animal transglutaminases. *Protein Sci* 8, 1714-9.
- [134] Miller, M.T., Bachmann, B.O., Townsend, C.A. and Rosenzweig, A.C. (2001). Structure of beta-lactam synthetase reveals how to synthesize antibiotics instead of asparagine. *Nat Struct Biol* 8, 684-9.
- [135] Miller, M.T., Bachmann, B.O., Townsend, C.A. and Rosenzweig, A.C. (2002). The catalytic cycle of beta-lactam synthetase observed by x-ray crystallographic snapshots. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14752-7.
- [136] Larsen, T.M., Boehlein, S.K., Schuster, S.M., Richards, N.G., Thoden, J.B., Holden, H.M. and Rayment, I. (1999). Three-dimensional structure of *Escherichia coli* asparagine synthetase B: a short journey from substrate to product. *Biochemistry* 38, 16146-57.
- [137] Delgado, M.A., Solbiati, J.O., Chiuchiolo, M.J., Farias, R.N. and Salomon, R.A. (1999). *Escherichia coli* outer membrane protein TolC is involved in production of the peptide antibiotic microcin J25. *J Bacteriol* 181, 1968-70.
- [138] Koronakis, V., Eswaran, J. and Hughes, C. (2004). Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu Rev Biochem* 73, 467-89.
- [139] Delgado, M.A., Vincent, P.A., Farias, R.N. and Salomon, R.A. (2005). Yojl of *Escherichia coli* functions as a microcin J25 efflux pump. *J Bacteriol* 187, 3465-70.
- [140] Destoumieux-Garzon, D., Duquesne, S., Peduzzi, J., Goulard, C., Desmadril, M., Letellier, L., Rebuffat, S. and Boulanger, P. (2005). The iron-siderophore transporter FhuA is the receptor for the antimicrobial peptide microcin J25: role of the microcin Val11-Pro16 beta-hairpin region in the recognition mechanism. *Biochem J* 389, 869-76.
- [141] Salomon, R.A. and Farias, R.N. (1993). The FhuA protein is involved in microcin 25 uptake. *J Bacteriol* 175, 7741-2.
- [142] Salomon, R.A. and Farias, R.N. (1995). The peptide antibiotic microcin 25 is imported through the TonB pathway and the SbmA protein. *J Bacteriol* 177, 3323-5.
- [143] Letellier, L. and Santamaria, M. (2002). The biochemical and physiological characteristics of surface receptors of gram negative bacteria. *Mini Rev Med Chem* 2, 343-51.
- [144] Delgado, M.A., Rintoul, M.R., Farias, R.N. and Salomon, R.A. (2001). *Escherichia coli* RNA polymerase is the target of the cyclopeptide antibiotic microcin J25. *J Bacteriol* 183, 4543-50.
- [145] Yuzenkova, J. et al. (2002). Mutations of bacterial RNA polymerase leading to resistance to microcin j25. *J Biol Chem* 277, 50867-75.
- [146] Pavlova, O., Mukhopadhyay, J., Sineva, E., Ebright, R.H. and Severinov, K. (2008). Systematic structure-activity analysis of microcin J25. *J Biol Chem* 283, 25589-95.
- [147] Cheung, W.L., Pan, S.J. and Link, A.J. (2010). Much of the Microcin J25 Leader Peptide is Dispensable. *J Am Chem Soc* 132, 2514-5.
- [148] Pan, S.J., Cheung, W.L. and Link, A.J. (2010). Engineered gene clusters for the production of the antimicrobial peptide microcin J25. *Protein Expr Purif* 71, 200-6.

- [149] Nygren, P.A., Stahl, S. and Uhlen, M. (1994). Engineering proteins to facilitate bioprocessing. *Trends Biotechnol* 12, 184-8.
- [150] Cardona, S.T. and Valvano, M.A. (2005). An expression vector containing a rhamnose-inducible promoter provides tightly regulated gene expression in *Burkholderia cenocepacia*. *Plasmid* 54, 219-28.
- [151] Kuliopulos, A. and Walsh, C.T. (1994). Production, Purification, and Cleavage of Tandem Repeats of Recombinant Peptides. *Journal of the American Chemical Society* 116, 4599-4607.
- [152] Fox, J.D., Routzahn, K.M., Bucher, M.H. and Waugh, D.S. (2003). Maltodextrin-binding proteins from diverse bacteria and archaea are potent solubility enhancers. *FEBS Lett* 537, 53-7.
- [153] Fox, J.D. and Waugh, D.S. (2003). Maltose-binding protein as a solubility enhancer. *Methods Mol Biol* 205, 99-117.
- [154] De Marco, V., Stier, G., Blandin, S. and de Marco, A. (2004). The solubility and stability of recombinant proteins are increased by their fusion to NusA. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 766-71.
- [155] Brett, P.J., DeShazer, D. and Woods, D.E. (1998). *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species. *Int J Syst Bacteriol* 48 Pt 1, 317-20.
- [156] Chiuchiolo, M.J., Delgado, M.A., Farias, R.N. and Salomon, R.A. (2001). Growth-phase-dependent expression of the cyclopeptide antibiotic microcin J25. *J Bacteriol* 183, 1755-64.
- [157] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Laboratory press, Cold spring Harbor, NY
- [158] Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- [159] Bennett, J. and Scott, K.J. (1971). Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal Biochem* 43, 173-82.
- [160] Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.
- [161] Gill, S.C. and von Hippel, P.H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182, 319-26.
- [162] Marugan, J.J. et al. (2005). Design, synthesis, and biological evaluation of novel potent and selective alphavbeta3/alphavbeta5 integrin dual inhibitors with improved bioavailability. Selection of the molecular core. *J Med Chem* 48, 926-34.
- [163] Dechantsreiter, M.A., Planker, E., Matha, B., Lohof, E., Holzemann, G., Jonczyk, A., Goodman, S.L. and Kessler, H. (1999). N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective alpha(V)beta(3) integrin antagonists. *J Med Chem* 42, 3033-40.
- [164] Zhao, L., Fan, W. and Xiaoyuan, C. (2008). Integrin alpha(V)beta(3)-targeted cancer therapy. *Drug Development Research* 69, 329-339.
- [165] Wüthrich, K. (1986) *NMR of Protein and Nucleic Acids*, Wiley. New York.
- [166] Berger, S. and Braun, S. (2004) *200 and More NMR Experiments. A Practical Course*, Wiley-VCH Verlag. Weinheim.
- [167] Marion, D., Ikura, M., Tschudin, R. and Bax, A. (1989). Rapid Recording of 2D NMR Spectra without Phase Cycling. Application to the Study of Hydrogen Exchange in Proteins. *J. Magn. Reson.* 85, 393-399.
- [168] Hwang, T.-L. and Shaka, A.J. (1995). Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Waveforms and Pulsed Field Gradients. *J. Magn. Reson. A* 112, 275-279.
- [169] Goddard, T.D. and Kneller, D.J. *SPARKY 3*, University of California, San Francisco.
- [170] Guntert, P., Braun, W., Billeter, M. and Wuthrich, K. (1989). Automated Stereospecific H-1-Nmr Assignments and Their Impact on the Precision of Protein-Structure Determinations in Solution. *Journal of the American Chemical Society* 111, 3997-4004.
- [171] Wagner, G. (1990). Nmr Investigations of Protein-Structure. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 22, 101-139.
- [172] Herrmann, T., Guntert, P. and Wuthrich, K. (2002). Protein NMR structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the torsion angle dynamics algorithm DYANA. *Journal of Molecular Biology* 319, 209-227.
- [173] Laskowski, R.A., Rullmann, J.A.C., MacArthur, M.W., Kaptein, R. and Thornton, J.M. (1996). AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *Journal of Biomolecular Nmr* 8, 477-486.
- [174] Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-10.
- [175] Breci, L.A., Tabb, D.L., Yates, J.R., 3rd and Wysocki, V.H. (2003). Cleavage N-terminal to proline: analysis of a database of peptide tandem mass spectra. *Anal Chem* 75, 1963-71.

- [176] LaVallie, E.R., DiBlasio-Smith, E.A., Collins-Racie, L.A., Lu, Z. and McCoy, J.M. (2003). Thioredoxin and related proteins as multifunctional fusion tags for soluble expression in *E. coli*. *Methods Mol Biol* 205, 119-40.
- [177] Marblestone, J.G., Edavettal, S.C., Lim, Y., Lim, P., Zuo, X. and Butt, T.R. (2006). Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO. *Protein Sci* 15, 182-9.
- [178] Schein, C.H. (1989). Production of Soluble Recombinant Proteins in Bacteria. *Nat Biotech* 7, 1141-1149.
- [179] Bryson, K., McGuffin, L.J., Marsden, R.L., Ward, J.J., Sodhi, J.S. and Jones, D.T. (2005). Protein structure prediction servers at University College London. *Nucleic Acids Res* 33, W36-8.
- [180] McCormack, J.G., Westergaard, N., Kristiansen, M., Brand, C.L. and Lau, J. (2001). Pharmacological approaches to inhibit endogenous glucose production as a means of anti-diabetic therapy. *Curr Pharm Des* 7, 1451-74.
- [181] Knappe, T.A., Linne, U., Zirah, S., Rebuffat, S., Xie, X. and Marahiel, M.A. (2008). Isolation and structural characterization of capistrin, a lasso peptide predicted from the genome sequence of *Burkholderia thailandensis* E264. *J Am Chem Soc* 130, 11446-54.
- [182] Knappe, T.A., Linne, U., Robbel, L. and Marahiel, M.A. (2009). Insights into the biosynthesis and stability of the lasso peptide capistrin. *Chem Biol* 16, 1290-8.
- [183] Takada, Y., Ye, X. and Simon, S. (2007). The integrins. *Genome Biol* 8, 215.
- [184] Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-87.
- [185] Jin, H. and Varner, J. (2004). Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br J Cancer* 90, 561-5.
- [186] Wilkinson, B. and Micklefield, J. (2007). Mining and engineering natural-product biosynthetic pathways. *Nat Chem Biol* 3, 379-86.
- [187] Martin, J.F. and Demain, A.L. (1980). Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol Rev* 44, 230-51.
- [188] Duerkop, B.A. et al. (2009). Quorum-sensing control of antibiotic synthesis in *Burkholderia thailandensis*. *J Bacteriol* 191, 3909-18.
- [189] Chandler, J.R., Duerkop, B.A., Hinz, A., West, T.E., Herman, J.P., Churchill, M.E., Skerrett, S.J. and Greenberg, E.P. (2009). Mutational analysis of *Burkholderia thailandensis* quorum sensing and self-aggregation. *J Bacteriol* 191, 5901-9.
- [190] Seyedsayamdost, M.R., Chandler, J.R., Blodgett, J.A., Lima, P.S., Duerkop, B.A., Oinuma, K., Greenberg, E.P. and Clardy, J. (2010). Quorum-sensing-regulated bactobolin production by *Burkholderia thailandensis* E264. *Org Lett* 12, 716-9.
- [191] Kimura, K., Yamazaki, M., Sasaki, N., Yamashita, T., Negishi, S., Nakamura, T. and Koshino, H. (2007). Novel propeptin analog, propeptin-2, missing two amino acid residues from the propeptin C-terminus loses antibiotic potency. *J Antibiot (Tokyo)* 60, 519-23.
- [192] Iwatsuki, M., Koizumi, Y., Gouda, H., Hirono, S., Tomoda, H. and Omura, S. (2009). Lys17 in the 'lasso' peptide lariatin A is responsible for anti-mycobacterial activity. *Bioorg Med Chem Lett* 19, 2888-90.
- [193] Notredame, C., Higgins, D.G. and Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302, 205-17.
- [194] Poirot, O., O'Toole, E. and Notredame, C. (2003). Tcoffee@igs: A web server for computing, evaluating and combining multiple sequence alignments. *Nucleic Acids Res* 31, 3503-6.
- [195] Scholz, C., Eckert, B., Hagn, F., Schaarschmidt, P., Balbach, J. and Schmid, F.X. (2006). SlyD proteins from different species exhibit high prolyl isomerase and chaperone activities. *Biochemistry* 45, 20-33.
- [196] Knappe, T.A., Eckert, B., Schaarschmidt, P., Scholz, C. and Schmid, F.X. (2007). Insertion of a chaperone domain converts FKBP12 into a powerful catalyst of protein folding. *J Mol Biol* 368, 1458-68.
- [197] Weininger, U. et al. (2009). NMR solution structure of SlyD from *Escherichia coli*: spatial separation of prolyl isomerase and chaperone function. *J Mol Biol* 387, 295-305.
- [198] Scholz, C., Schaarschmidt, P., Engel, A.M., Andres, H., Schmitt, U., Faatz, E., Balbach, J. and Schmid, F.X. (2005). Functional solubilization of aggregation-prone HIV envelope proteins by covalent fusion with chaperone modules. *J Mol Biol* 345, 1229-41.
- [199] Scholz, C. et al. (2008). Chaperone-aided in vitro renaturation of an engineered E1 envelope protein for detection of anti-*Rubella* virus IgG antibodies. *Biochemistry* 47, 4276-87.
- [200] Li, Y.M., Milne, J.C., Madison, L.L., Kolter, R. and Walsh, C.T. (1996). From peptide precursors to oxazole and thiazole-containing peptide antibiotics: microcin B17 synthase. *Science* 274, 1188-93.
- [201] Richards, N.G. and Kilberg, M.S. (2006). Asparagine synthetase chemotherapy. *Annu Rev Biochem* 75, 629-54.

- [202] Semenova, E., Yuzenkova, Y., Peduzzi, J., Rebuffat, S. and Severinov, K. (2005). Structure-activity analysis of microcinJ25: distinct parts of the threaded lasso molecule are responsible for interaction with bacterial RNA polymerase. *J Bacteriol* 187, 3859-63.
- [203] Mahenthiralingam, E., Urban, T.A. and Goldberg, J.B. (2005). The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat Rev Microbiol* 3, 144-56.
- [204] Mahenthiralingam, E., Baldwin, A. and Dowson, C.G. (2008). *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *J Appl Microbiol*
- [205] Lipuma, J.J. (2005). Update on the *Burkholderia cepacia* complex. *Curr Opin Pulm Med* 11, 528-33.
- [206] McGowan, J.E., Jr. (2006). Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Infect Control* 34, S29-37; discussion S64-73.
- [207] George, A.M., Jones, P.M. and Middleton, P.G. (2009). Cystic fibrosis infections: treatment strategies and prospects. *FEMS Microbiol Lett* 300, 153-64.
- [208] Whitlock, G.C., Estes, D.M. and Torres, A.G. (2007). Glanders: off to the races with *Burkholderia mallei*. *FEMS Microbiol Lett* 277, 115-22.
- [209] Adler, N.R., Govan, B., Cullinane, M., Harper, M., Adler, B. and Boyce, J.D. (2009). The molecular and cellular basis of pathogenesis in melioidosis: how does *Burkholderia pseudomallei* cause disease? *FEMS Microbiol Rev* 33, 1079-99.
- [210] Potterat, O., Streicher, R., Wagner, K., Maurer, T., Mack, J. and Peters, S. (2004). Bicyclic oligopeptides. Patent US 7101848.
- [211] Krause, S., Schmoldt, H.U., Wentzel, A., Ballmaier, M., Friedrich, K. and Kolmar, H. (2007). Grafting of thrombopoietin-mimetic peptides into cystine knot miniproteins yields high-affinity thrombopoietin antagonists and agonists. *FEBS J* 274, 86-95.
- [212] Stupp, R. and Ruegg, C. (2007). Integrin inhibitors reaching the clinic. *J Clin Oncol* 25, 1637-8.
- [213] Minniti, G., Muni, R., Lanzetta, G., Marchetti, P. and Enrici, R.M. (2009). Chemotherapy for glioblastoma: current treatment and future perspectives for cytotoxic and targeted agents. *Anticancer Res* 29, 5171-84.

Danksagung

Ich möchte mich vor allem ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel für die anspruchsvolle und sehr interessante Themenstellung sowie seine ständige Diskussionsbereitschaft bedanken. Besonders hervorheben möchte ich die finanzielle Unterstützung, die mir die Teilnahme am 30. Europäischen Peptidsymposium in Helsinki und die jährlichen Reisen zu unseren Kooperationspartnern um Prof. Dr. Sylvie Rebuffat in Paris ermöglicht hat. Die dabei gesammelten Eindrücke haben zusammen mit den Freiheiten, die mir Herr Marahiel bei der Ausarbeitung der Fragestellung einräumte, entscheidend zum Gelingen und zur aktuellen Gestalt der Arbeit beigetragen. Nicht unerwähnt lassen möchte ich die hervorragende Infrastruktur des Arbeitskreises von Herrn Marahiel sowie des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg, ohne die viele der durchgeführten Experimente nicht möglich gewesen wären.

Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen danke ich für die freundliche Aufnahme in Marburg, seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Buckel und Herrn Prof. Dr. Eric Meggers möchte ich mich für ihre Bereitschaft bedanken, als Mitglieder der Prüfungskommission meiner Disputation beizuwohnen.

Herrn Dr. Georg Schoenafinger möchte ich für die freundliche Aufnahme in Marburg und für die Einarbeitung in das Thema danken. Ihm und allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Labors 4716 gebührt ein besonderer Dank für die nette, kollegiale und durchweg witzige Arbeitsatmosphäre. In diesem Sinne möchte ich mich bei den von mir mitbetreuten Diplomanden Peter Tufar, Eldar Zent, Nora Reinhardt, Marcel Zimmermann und Michael Gattner bedanken, die durch ihre kritische und unvoreingenommene Art zur Etablierung der Forschung an ribosomalen Peptiden im Arbeitskreis Marahiel beigetragen haben. Ferner möchte ich mich bei Florian Ritterbusch, Marcel Zimmermann, Kathrin Pieses und Michael Gattner für die engagierte Arbeit während des Vertiefungspraktikums bedanken.

Bei Antje Schäfer möchte ich mich für ihre Hilfe und die sehr gute Zusammenarbeit bei der Proteinexpression und Lasso-peptidfermentation bedanken, wo Sie mich stets mit großem Engagement unterstützt hat. Gabi Schimpff-Weiland und Christiane Bomm danke ich für ihren täglichen Beitrag, die optimale Infrastruktur des Arbeitskreises Marahiel zu gewährleisten. Roswitha Roller-Müller danke ich für viele nette Gespräche und die Hilfestellung bei allerlei Verwaltungsangelegenheiten.

Dr. Uwe Linne möchte ich besonders für die Hilfestellung und Einarbeitung in die Massenspektrometrie von Peptiden, sowie für seinen Beitrag beim Anfertigen der Manuskripte danken. Darüber hinaus möchte ich mich bei seinen Mitarbeitern der Abteilung für Massenspektrometrie Jan Bamberger und Natalia Fritzler bedanken.

Frau Dr. Xiulan Xie gebührt ein sehr großer Dank für das Lösen der NMR-Strukturen von Capistruin und BI-32169 sowie ihre ständige Hilfsbereitschaft und Kooperation beim Anfertigen der Manuskripte.

Den Kooperationspartnern Frau Prof. Dr. Sylvie Rebuffat und Dr. Severine Zirah (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris), Herrn Dr. Florenz Sasse (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig), Herrn Prof. Dr. Horst Kessler, Dr. Carles Mas und Dr. Florian Manzenrieder (Technische Universität München) sowie Prof. Dr. John Govan (University of Edinburgh) danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit bei den biologischen Aktivitätsuntersuchungen der Lassoptide.

Dr. Verena Helmetag, Lars Robbel und Dr. Uwe Linne danke ich für das gründliche Korrekturlesen dieser Arbeit.

Allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Arbeitskreises Marahiel möchte ich für die super Arbeitsatmosphäre sowie für die „philosophischen“ Gespräche im Kaffeeraum danken. Die sehr entspannte und lockere Stimmung hat immer wieder dazu beigetragen, lange Arbeitszeiten und wissenschaftliche Rückschläge zu verdauen.

Dem Fonds der Chemischen Industrie möchte ich für die finanzielle Unterstützung während meiner Promotion durch das Kekulé-Stipendium danken.

Der größte Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester Daniela, die mich im Laufe meines Lebens in jeder Hinsicht unterstützt haben. Ohne diesen Rückhalt wären mein Studium und auch die Doktorarbeit nicht in dieser Form möglich gewesen.

Die Dankbarkeit, die ich meiner Freundin Kamila gegenüber empfinde, ist schwer in Worte zu fassen. Ich bin einfach unendlich dankbar, dass ich Sie im Laufe meiner Doktorarbeit kennen lernen durfte, und freue mich auf unsere gemeinsame Zukunft. Ihr möchte ich diese Arbeit widmen.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Rationale Strategien zur Isolierung bakterieller Lasso peptide – Struktur, Biosynthese und Anwendungspotential“ selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als den von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg an der Lahn, 29.03.2010

(Ort, Datum)

(Unterschrift)